

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik
JLU-Gießen

Betreuerin: PD Dr. Natali Bauer

**De Novo Referenzintervallerstellung ausgewählter Parameter
der plasmatischen Gerinnung von Katzen unter besonderer
Berücksichtigung der physiologischen Inhibitoren**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Carolin Engelen
Tierärztin aus Bonn

Gießen 2018

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

PD Dr. Natali Bauer

Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

Tag der Disputation: 10. Juli 2018

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis.....	7
1. Einleitung	9
2. Literaturübersicht.....	11
2.1 Physiologie der Hämostase	11
2.1.1 Primäre Hämostase	11
2.1.1.1 Endothel	12
2.1.1.2 Thrombozyten.....	13
2.1.2 Sekundäre Hämostase	14
2.1.3 Inhibitoren der Gerinnung.....	17
2.1.3.1 Antithrombin.....	18
2.1.3.2 Protein C.....	19
2.1.3.3 Protein S.....	19
2.1.4 Tertiäre Hämostase/ Fibrinolyse	21
2.2 Defekte der sekundären Hämostase.....	22
2.2.1 Angeborene Koagulopathien.....	22
2.2.2 Erworbene Koagulopathien.....	23
2.3 Diagnostik.....	26
2.4 Referenzintervallermittlung.....	28
3. Material und Methoden	32
3.1 Studiendesign.....	32
3.2 Probanden	32

Inhaltsverzeichnis

3.3	Blutentnahme und Handling der Proben	33
3.4	Voruntersuchungen	34
3.5	Methodik der Messungen am STA Compact®	35
3.5.1	Allgemeines	35
3.5.2	Spezielle Tests.....	36
3.5.2.1	PT, aPTT, TT, Fibrinogen und APC-R.....	37
3.5.2.2	Faktor VIII, Faktor XII, Protein C und Protein S	37
3.5.2.3	Antithrombin und anti-Faktor Xa.....	39
3.5.2.4	D-Dimere	40
3.6	Untersuchungen.....	40
3.6.1	Replikationsstudien (Wiederholbarkeit)	40
3.6.2	Interferenzen	41
3.6.3	Stabilität der Proben.....	44
3.6.4	Referenzintervallerstellung	44
3.6.5	Geschlechtervergleich	45
4.	Statistik	47
4.1	Replikationsstudien (Wiederholbarkeit)	47
4.2	Interferenzen.....	47
4.3	Stabilität der Proben	48
4.4	Referenzintervallerstellung.....	48
4.5	Geschlechtervergleich.....	49
5.	Ergebnisse.....	50
5.1	Voruntersuchungen	50
5.2	Replikationsstudien (Wiederholbarkeit)	53
5.3	Interferenzen.....	56
5.4	Stabilität der Proben	60

5.5	Referenzintervalle	61
5.6	Geschlechtervergleich	70
6.	Diskussion	73
6.1	Voruntersuchungen	73
6.2	Replikationsstudien (Wiederholbarkeit)	75
6.3	Interferenzen.....	81
6.4	Stabilität der Proben	84
6.5	Referenzintervalle	86
6.6	Geschlechtervergleich	103
7.	Zusammenfassung.....	105
8.	Summary.....	109
9.	Literaturverzeichnis	112
10.	Danksagung.....	137

Abkürzungsverzeichnis

aFXa = anti-Faktor Xa

APC = aktiviertes Protein C

APC-R = Resistenz gegen aktiviertes Protein C

aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit

ASVCP = Amerikanische Gesellschaft für klinische Labordiagnostik in der Veterinärmedizin
(aus dem Englischen: American Society of Veterinary Clinical Pathology)

AT = Antithrombin

CLSI = Clinical & Laboratory Standards Institute

CV = Variationskoeffizient (aus dem Englischen: coefficient of variation)

DIC = disseminierte intravasale Gerinnung

F = Faktor

FDPs = Fibrinogen-Degradations Produkte

HMWK = Hochmolekulargewicht-Kininogen

I = Impräzision

k. A. = keine Angabe

MW = Mittelwert

PC = Protein C

PK = Präkallikrein

PS = Protein S

PT = Prothrombinzeit

RI = Referenzintervall

SD = Standardabweichung

SE = systemischer Fehler

TE_a = absolut erlaubter Gesamtfehler (aus dem Englischen: total allowable error)

TF = Gewebefaktor (aus dem Englischen: tissue factor)

TFPI = tissue factor pathway inhibitor

t-PA = Plasminogen-Aktivator vom Gewebetyp

TT = Thrombinzeit

VC = Variationskoeffizient

vWF = von Willebrand Faktor

WCI = Weite des Konfidenzintervalls

WRI = Weite des Referenzintervalls

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Ablaufes der sekundären Hämostase.	15
Abbildung 2: Modifizierung der Abbildung 1 mit Darstellung der Einwirkung der physiologischen Inhibitoren (bunt).	21
Abbildung 3: Fotografie der 3 zur Lipämie-Interferenzmessung verwendeten Verdünnungen.	42
Abbildung 4: Fotografie der 3 Verdünnungen der Hämolyse-Interferenzmessung.	43
Abbildung 5: Aktivität der Normalkontrolle der Parameter Faktor XII, Faktor VIII, Protein C und Protein S gemessen aus dem Probanden-Poolplasma an den einzelnen Messtagen.	55
Abbildung 6: Verteilung der Messergebnisse der Referenzintervallermittlung.	65
Abbildung 7: Histogramme der beobachteten Verteilung (dunkelblaue Linie) untransformierter Daten der untersuchten Parameter für die Referenzintervallermittlung.	67
Abbildung 8: Einfluss des Geschlechts auf die Referenzintervalle dargestellt als Box- und Whisker Diagramm.	71
Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung der durchgeführten Kalibrationen in Doppelmessungen	73
Abbildung 10: Vereinfachtes Schaubild zur Darstellung möglicher Auswirkungen der Verdünnungen auf die Messergebnisse.	74
Abbildung 11: Histogramm der Datenverteilung der tiefen Population von Protein C.	98
Abbildung 12: Histogramm der Verteilung nicht transformierter Daten der tiefen Population von Protein S.	100
Abbildung 13: Quantil-Quantil Plot der tiefen Population von Protein S nach BoxCox-Transformation.	100
Abbildung 14: Histogramm der Verteilung nicht transformierter Daten der hohen Population von Protein S.	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der Messungen aus dem Katzenpoolplasma mit den Einstellungen der humanen Standardkurve im Vergleich zu den Herstellerangaben der Normalkontrolle.	50
Tabelle 2: Für die Kalibrationen getestete Verdünnungsreihen mit resultierendem Korrelationskoeffizient.	52
Tabelle 3: Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizienten (VC) der Wiederholbarkeitsmessungen (intra-assay VC in hellgrau, inter-assay VC in mittelgrau) der untersuchten Parameter.	55
Tabelle 4: Einfluss einer Lipämie auf die Messergebnisse.	58
Tabelle 5: Einfluss einer Hämolyse auf die Messergebnisse.	60
Tabelle 6: Ergebnisse des Lagerungsversuchs von Citratplasma zweier Einzelkatzen.....	61
Tabelle 7: Referenzintervalle, Konfidenzintervalle, Spannbreite, Median und Mittelwerte der untersuchten Parameter.	64
Tabelle 8: Spannbreite der Referenz- und Konfidenzintervalle sowie ihre Quotienten zur Überprüfung der Sicherheit der unteren und oberen Grenzen der Referenzintervalle.	64
Tabelle 9: Nachmessungen der Werte von Protein C und Protein S einzelner Katzen.....	69
Tabelle 10: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten intra-assay (zehnfache Messung) und inter-assay (6 Messungen) Variationskoeffizienten mit den Ergebnissen einer Studie bei Hunden und den Herstellerangaben.	77
Tabelle 11: Vergleich des in der Interferenzstudie ermittelten systemischen Fehlers mit in einer Datenbank (Westgard QC) veröffentlichten Werten.	82
Tabelle 12: Vergleich der hier bestimmten Referenzintervalle mit bereits publizierten Referenzintervallen.	91
Tabelle 13: Vergleich der Referenzintervalle (2,5 bis 97,5 Perzentil) von Protein C mit Studien beim Hund.	97
Tabelle 14: Berechnete Referenzintervalle und Konfidenzintervalle für die tiefe Population (Werte unter 300 %) von Protein C.	98
Tabelle 15: Referenzintervalle, 90 %igen Konfidenzintervalle (CI) sowie Mittelwerte und Mediane der hohen und tiefen Population von Protein S.	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 16: Vergleich der Referenzintervalle des physiologischen Inhibitors Protein S mit Studien bei Hund und Mensch.	102
---	-----

1. Einleitung

Die Erforschung der Hämostase reicht weit in die Geschichte zurück (1) und steht dennoch heute mehr im Fokus denn je. Dabei sind heutzutage insbesondere die Ursachen und Risikofaktoren für thrombotische Erkrankungen Objekt veterinärmedizinischer Untersuchungen. Bereits 1856 hat Rudolf von Virchow in seinen gesammelten Abhandlungen (2) die drei Ursachen zur Entwicklung einer Thrombembolie beschrieben: Gefäßwandschädigung, verlangsamte Blutströmung und erhöhte Blutviskosität. Verschiedene Erkrankungen – angeboren oder erworben - können die physiologische Balance zwischen Aktivatoren und Inhibitoren der Gerinnung (3) verändern mit einer Tendenz zu entweder Blutungen oder Thrombosen. In allen Fällen ist eine zeitnahe Diagnosestellung wichtig, um das Überleben der Patienten zu sichern. Die üblicherweise durchgeführten Routineuntersuchungen der Gerinnung wie die Prothrombinzeit (PT) oder die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) stellen ein wichtiges diagnostisches Werkzeug zur Überprüfung einer Blutungsneigung (Hypokoagulabilität) dar, können allerdings nicht zur Aufarbeitung einer Thromboseneigung (Hyperkoagulabilität) genutzt werden. Diesbezüglich kann die Messung der Inhibitoren der Gerinnung von Nutzen sein, da heutzutage bekannt ist, dass eine Hemmung der physiologischen Inhibitoren der Gerinnung (Antithrombin, Protein C Komplex) zum Beispiel im Rahmen einer Sepsis (4, 5) zu einem prokoagulatorischem Milieu bzw. einer Thromboseneigung führen kann (3). Studien hinsichtlich der physiologischen Inhibitoren bei Katzen sind jedoch rar. Zur Etablierung dieser Tests sind eine Geräte- und Spezies-spezifische Methodenvvalidierung sowie eine Referenzintervallermittlung erforderlich. Auch vor Verwendung von Routineparametern der Gerinnung sollten laborinterne Referenzintervalle nach Methodenvvalidierung erstellt werden.

Daher ist es Ziel dieser Dissertationsarbeit, Referenzintervalle für die plasmatische Gerinnung (PT, aPTT, Thrombinzeit, Fibrinogen, Faktor VIII, Faktor XII, Resistenz gegen aktiviertes Protein C, anti-Faktor Xa, D-Dimere) sowie insbesondere die physiologischen Inhibitoren (Antithrombin, Protein C, Protein S) von Katzen gemessen am automatischen Gerinnungsanalysegerät STA Compact® (Stago Germany, Düsseldorf, Deutschland) zu erstellen. In diesem Rahmen erfolgte eine Validierung der analytischen Variation der

Einleitung

Methode (Wiederholbarkeit, Interferenzen, Stabilität). Zudem wurde der Einfluss des Geschlechts als Teil der biologischen Variation überprüft.

2. Literaturübersicht

2.1 *Physiologie der Hämostase*

Die Hämostase ist ein lebensnotwendiger Prozess (6), der aus einem komplexen, koordinierten und ausbalancierten System besteht (7, 8). Es ist das Ziel der Hämostase, den Blutfluss aufrecht zu erhalten, die Integrität der Gefäße zu gewährleisten (9, 10) und im Falle eines geschädigten Gefäßes eine rasche und auf den Ort des Defektes beschränkte Formation eines Gerinnsels zu ermöglichen und somit einen exzessiven Blutverlust zu vermeiden (1, 8, 11). Dies benötigt ein Gleichgewicht zwischen Gerinnung, Inhibition und Fibrinolyse (9), das durch ein Zusammenspiel aus den Gefäßwänden, Thrombozyten, prokoagulatorischen Faktoren, fibrinolytischen Faktoren und den physiologischen Inhibitoren erreicht wird (6, 7, 9, 12).

Der Gerinnungsprozess wird traditionell in drei Stadien eingeteilt (7, 13, 14):

- 1) Primäre/ zelluläre Hämostase
- 2) Sekundäre/ plasmatische Hämostase
- 3) Fibrinolyse und Gerinnungsinhibition.

Das neue Verständnis der Gerinnung (cell-based model of hemostasis) geht von einer *in vivo* in 3 Schritten überlappenden Koagulation aus, die eine Beteiligung zweier Zelltypen (Gewebefaktor-tragende Zellen und Thrombozyten) benötigt (15). Sie kann weiter eingeteilt werden in eine Initiationsphase, eine Amplifikationsphase und eine Propagationsphase (15).

Da die diagnostischen Möglichkeiten auf dem traditionellen Verständnis der Gerinnung beruhen, wird im Folgenden die klassische Einteilung beibehalten.

2.1.1 *Primäre Hämostase*

Die primäre Hämostase stellt die initiale Antwort auf einen Endothelschaden dar (8) und tritt nicht nur bei einer Schädigung, sondern auch im Rahmen der physiologischen Erneuerung von Endothelzellen (bei natürlichem Zelltod) auf (16).

2.1.1.1 *Endothel*

Physiologisches Endothel verfügt über eine antithrombotische Oberfläche, welche die Anheftung von Thrombozyten sowie die Aktivierung der Koagulationskaskade verhindert (17) und somit die Aufrechterhaltung des Blutflusses gewährleistet (18). Diese antithrombotische Eigenschaft des Endothels beruht auf antikoagulatorischen, profibrinolytischen und antithrombozytären Faktoren (17). Zudem bildet physiologisches Endothel eine Barriere als mechanischen Schutz, der einen Kontakt des zirkulierenden Blutes mit thrombogenen subendothelialen Komponenten verhindert (8, 19).

Zu den antithrombotischen Faktoren zählen dabei unter anderem Prostaglandin I₂ (20), Prostacyclin (17) und der Vasodilator Stickstoffmonoxid (NO) (21). Die von Endothelzellen exprimierten Heparansulfate wirken weiterhin antithrombotisch, indem sie eine Bindung mit dem physiologischen Inhibitor Antithrombin eingehen können, wodurch dieser seine Zielproteasen (wie Faktor Xa oder Thrombin) inaktivieren kann (18, 22, 23).

Eine weitere wichtige antikoagulatorische Komponente stellt das von Endothelzellen exprimierte Thrombomodulin (24, 25) dar, welches Thrombin bindet und dessen katalytische Eigenschaften verändert (26). Dieser Thrombomodulin-Thrombin Komplex führt zu einer schnellen Aktivierung von Protein C, einem Inhibitor der Koagulation (25, 27, 28). Außerdem inhibiert Thrombomodulin durch Kompetition die prokoagulatorischen Eigenschaften des Thrombins (17), da Thrombin in dieser an Thrombomodulin gebundenen Form nicht Fibrinogen spalten oder den Faktor V aktivieren kann (17, 26). Auch der auf Oberflächen von Endothelzellen vorhandene tissue factor pathway inhibitor (TFPI) wirkt antikoagulatorisch, indem er die Thrombingenerierung durch eine Inaktivierung von FXa und dem Komplex aus Gewebefaktor (TF) und FVIIa verhindert (29). Profibrinolytisch und somit antithrombotisch wirken Endothelzellen durch die Synthese von dem Plasminogenaktivator vom Gewebetyp (t-PA) (17).

Bei einem Gewebeschaden durch Trauma, Neoplasie oder Entzündung (30) erfolgt die Einleitung einer Gerinnselbildung durch verschiedene Faktoren. Die primäre Hämostase wird eingeleitet durch die Exposition von von-Willebrand-Faktor (vWF) (31, 32), welcher eine Rolle in der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation spielt und somit zu den prokoagulatorischen Eigenschaften des Endothels gezählt werden kann. Weiterhin hat vWF eine Funktion in der Biologie des FVIII (33, 34). Auch die sekundäre Hämostase

wird bei einem Endothelzellschaden eingeleitet durch die Exposition von Gewebefaktor (35), an den der plasmatische Faktor VII/VIIa (FVII/FVIIa) gebunden wird (36).

2.1.1.2 *Thrombozyten*

Thrombozyten werden durch Fragmentation aus dem Zytoplasma von Megakaryozyten gebildet und stellen den wichtigsten Bestandteil der primären Hämostase dar (37). Durch eine Interaktion eines Membranproteins der Thrombozyten, des Glykoproteins Ib, mit dem vWF (38) kann eine Adhäsion der Thrombozyten an subendotheliale Kollagenstrukturen erfolgen. Dabei erfüllt der vWF durch eine Bindung beider Seiten (Thrombozyten und Kollagen) eine Mediatorfunktion (11). Die Bindung der Thrombozyten führt zu einer Konformationsänderung, zur Thrombozytenaktivierung sowie zur Freisetzung der in den Thrombozyten enthaltenen Granula (30). Dieser Prozess resultiert in einer Aggregation der Thrombozyten, wobei die aktivierten Thrombozyten eine Phospholipid-haltige und somit prokoagulatorische Oberfläche aufweisen und somit die Entstehung eines Fibrin-reichen Gerinnsels fördern (19, 35).

Bereits 1952 wurde gezeigt, dass Thrombozyten einen Einfluss auf die sekundäre Hämostase haben, da eine verminderte Thrombozytenzahl zu einer Verminderung an geformten Thrombin führte (39). Neben der negativ geladenen Oberfläche, die als primärer Ort der Thrombingenerierung gilt (18), wirken Thrombozyten als Teil der sekundären Hämostase, indem sie lösliche Faktoren zur Stabilisierung des gebildeten Thrombus freisetzen (30). Dazu gehören in den α -Granula gespeicherte Substanzen (z. B. Platelet derived growth factor, Fibronectin, Fibrinogen, die Faktoren V und VIII, vWF) und die in den δ -Granula gespeicherten Substanzen (z. B. Adenosindiphosphat und –triphosphat, Calcium Ionen) (16). Auch der Fibrin-stabilisierende Faktor (FXIII) (16), die fibrinolytischen Substanz Plasminogen (40), die Inhibitoren der Gerinnung Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PA1-1) und Alpha 2-Antiplasmin (41), der Faktor XI und das inhibitorische Protein S (42) sind in Thrombozyten enthalten.

Neben einer Aktivierung durch Adhäsion kann auch eine durch Thrombin vermittelte Aktivierung der Thrombozyten, z. B. im Rahmen einer Entzündung, stattfinden (16). Wenn Thrombin allerdings an Thrombomodulin gebunden vorliegt, kann es weder an Thrombozyten binden noch diese aktivieren (43). Zudem veranlasst die

Thrombozytenaktivierung Endothelzellen dazu, Moleküle zu synthetisieren und zu sezernieren, welche die Gerinnselbildung limitieren (19).

Eine Thrombozytopenie ist eine häufige Ursache für Blutungen und kann durch eine verminderte Produktion, eine vermehrte Zerstörung oder eine Sequestration bedingt sein (16). Blutungen bei physiologischer Thrombozytenzahl können auf einer Dysfunktion der Thrombozyten (Thrombozytopathie) beruhen (44). Eine Thrombozytopathie ist in der Veterinärmedizin seltener als eine Thrombozytopenie und kann angeboren oder erworben auftreten, z. B. im Rahmen von Leber- oder Nierenerkrankungen, iatrogen bei Gabe von nicht steroidal Antiphlogistika, Infektionserkrankungen (Ehrlichiose, Felines Leukämievirus) oder einer Neoplasie (16, 45).

2.1.2 Sekundäre Hämostase

Die in der Literatur auch als Koagulation bezeichnete (40) sekundäre Hämostase beinhaltet eine miteinander verbundene Serie von Enzym-aktivierenden Stufen, die in einer Thrombingenerierung und somit einer Umwandlung des Fibrinogens zu Fibrin resultieren (46). Sie wird ebenso wie die primäre Hämostase durch einen Endothelzellschaden initiiert und führt zur Bildung eines Fibringerinnsels, das über das in der primären Hämostase entstandene thrombozytäre Gerinnsel zur Stabilisierung gelegt wird (8). Sie funktioniert als eine Kaskade enzymatischer Schritte (46, 47), bei denen aus inaktiven Proenzymen, sogenannten Zymogenen (48), mittels Proteolyse aktive Enzyme gebildet werden (30). Die meisten Einzelschritte umfassen ein Enzym, bei dem es sich häufig um eine Serinprotease handelt (18), ein Substrat sowie teils einen Cofaktor. Häufig sind diese enzymatischen Prozesse auf Phospholipid-Oberflächen lokalisiert in Anwesenheit von freiem Calcium (Ca^{2+}) (40). Die Nachsilbe „a“ wird in der Kaskade genutzt, um den aktivierten Zustand eines Enzyms anzuzeigen (46). Als primärer Bildungsort der Koagulationsfaktoren – mit Ausnahme des Faktors VIII (7) – gelten die Hepatozyten (8). Diese Koagulationskaskade wird klassischerweise - wie in Abbildung 1 dargestellt - in drei Wege eingeteilt (11, 49), die *in vitro* unabhängig voneinander untersucht werden können:

- (1) Extrinsischer Weg
- (2) Intrinsischer Weg

(3) Gemeinsamer Weg.

Diese Einteilung kommt als solches *in vivo* nicht vor, ist jedoch nützlich, um die Koagulation labordiagnostisch zu evaluieren (18).

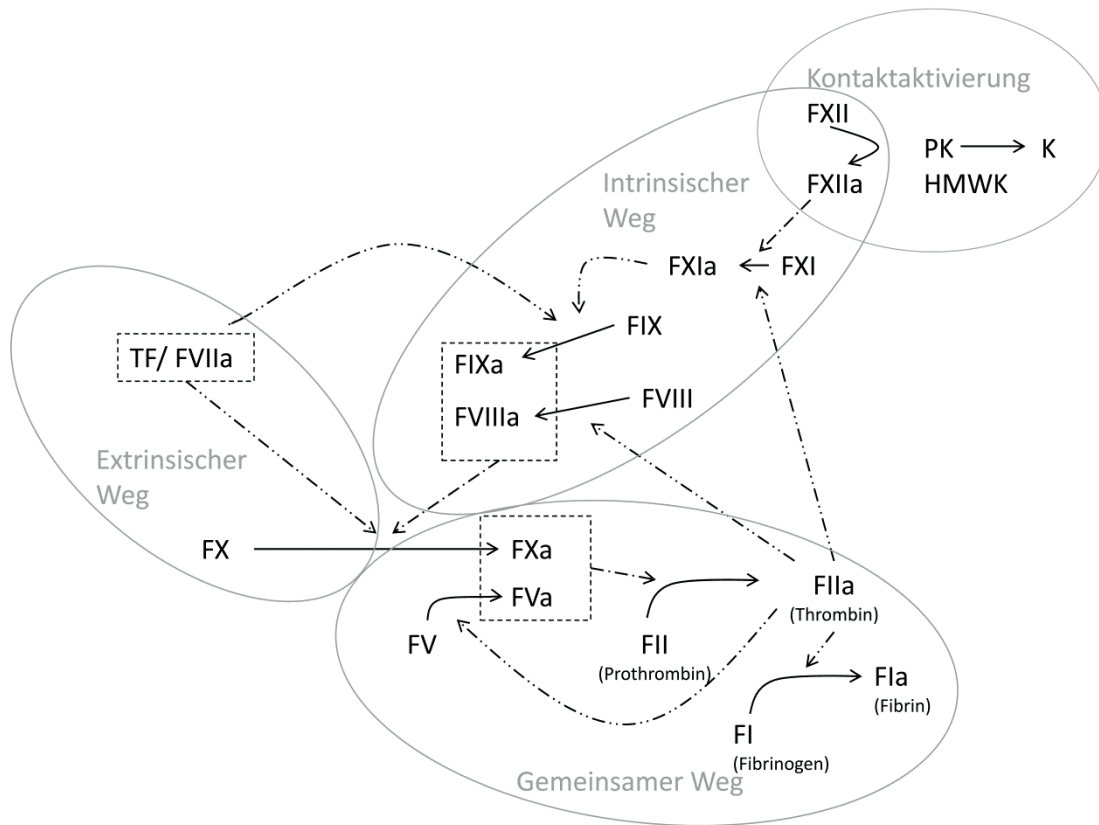


Abbildung 1: Darstellung des Ablaufes der sekundären Hämostase.

Die gestrichelten Pfeile zeigen einen Aktivierungsschritt an und die soliden Pfeile die Umformung des jeweiligen Faktors. Die in gestrichelten Kästchen zusammengefassten Faktoren bilden jeweils einen Komplex. In den grauen Ovalen sind die verschiedenen aufgeteilten Schritte der sekundären Hämostase zusammengefasst

Abk.: TF = tissue factor (Gewebethromboplastin), F = Faktor, PK = Präkallikrein, K = Kallikrein, HMWK = Hochmolekulargewicht-Kininogen, (I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII) = römische Ziffern, a = aktiviert

Zum extrinsischen System zählt der Faktor FVII bzw. FVIIa, der nach einem Zellschaden Kontakt mit dem Gewebefaktor (tissue factor, TF; auch bekannt als Koagulationsfaktor III oder Gewebethromboplastin (36, 50, 51)) erlangt, wobei der entstehende TF:FVIIa Komplex weiterhin sowohl das intrinsische System durch eine Aktivierung des Faktors FXI im Beisein von Ca^{2+} (52) als auch den gemeinsamen Weg über eine Aktivierung des Faktors X in Gang setzt (36, 53). Der Name extrinsisch beruht dabei auf einem für diesen

Weg benötigten außerhalb des Gefäßsystems liegenden (extrinsischen) Triggers (Gewebefaktor) (18). Die Biosynthese der Faktoren VII und X des extrinsischen bzw. gemeinsamen Weges sowie der Faktoren IX und II des intrinsischen Weges ist Vitamin-K-anhängig (11, 54).

Das intrinsische System, dem die Faktoren XII, XI, IX und VIII zugeordnet sind, wird neben einer Aktivierung durch den TF:FVIIa Komplex (52, 55) durch eine Kontaktaktivierung des Faktors XII mit einer nicht-endothelialen Oberfläche (z. B. Kollagen) oder der negativ-geladenen Phospholipid-Oberfläche der Thrombozyten in Zusammenspiel mit Präkallikrein (PK) und dem Cofaktor Hochmolekulargewicht-Kininogen (HMWK) gestartet (56, 57). Kaskadenartig bewirkt der aktivierte Faktor XIIa eine Aktivierung des Faktors XI zu Faktor XIa, welcher wiederum den Faktor IX zu FIXa aktiviert (46). Der aktivierte Faktor IX (FIXa) und der aktivierte Faktor VIII (FVIIIa) bilden im Beisein von Calcium einen Komplex auf Phospholipid-Oberflächen, den hoch reaktiven „Tenase“-Komplex (58), welcher zu einer Aktivierung des Faktors X führt (46, 48). Der nicht aktivierte Faktor VIII liegt im Plasma gebunden an den vWF vor, welcher dessen Stabilisierung dient (33, 34).

Namensgebend für den intrinsischen Weg ist die Tatsache, dass dieser Weg innerhalb des Blutgefäßsystems (intrinsisch) ablaufen kann und keine externen Faktoren benötigt (18). Allerdings führt auch der Kontakt mit künstlichen Materialien wie Glas oder Kaolin zu Aktivierung des Faktor XII (59).

Beide Wege (extrinsisch und intrinsisch) münden in einer gemeinsamen Endstrecke, an deren Ende die Generierung von Thrombin sowie schließlich die Bildung eines Fibringerinnsels steht (11). Zu diesem gemeinsamen Weg werden die Gerinnungsfaktoren X, V, II (Prothrombin) und I (Fibrinogen) gezählt. Der durch den vorgeschalteten (extrinsischen oder intrinsischen) Weg aktivierte Faktor X (FXa) aktiviert wiederum seinen Cofaktor FV (zu FVa), mit dem er zusammen mit Phospholipiden und Ca^{2+} (60) einen Komplex, den Prothrombinase-Komplex, bildet (48). Dieser bewirkt seinerseits die Transformation von Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) (60, 61). Die Entstehung von Thrombin ist der letzte Schritt innerhalb der Initiation der Koagulation und der ausschlaggebende Schritt der Hämostase (61).

Thrombin bewirkt durch eine Abspaltung der Fibrinopeptide A und B (62) die Entstehung löslicher Fibrinmonomere, die eine nicht kovalente Bindung mit anderen Fibrinmonomeren eingehen, was zur Bildung eines Fibrinpolymers führt (63). Durch den

ebenfalls von Thrombin aktivierten Fibrin-stabilisierenden Faktor (FXIIIa) (64, 65) wird anschließend eine Quervernetzung der benachbarten Einheiten innerhalb eines Polymers zur Stabilisierung des Thrombus induziert (66).

Eine weitere Funktion von Thrombin ist die Aktivierung der Faktoren V, VIII und XI und des Inhibitors Protein C sowie eine Aktivierung von Thrombozyten und Fibrinolyse (61).

Zudem ist Fibrinogen nicht nur wichtig als Vorläufersubstanz von Fibrin, sondern spielt auch eine Rolle bei der Aggregation aktivierter Thrombozyten und als Akute Phase Protein (62, 63, 67).

In vivo wird der extrinsische Weg mit der daraus resultierenden Thrombingenerierung als der primäre Aktivator der Koagulation angesehen (68, 69). Obwohl der intrinsische Weg die Koagulation ebenfalls zu aktivieren vermag, scheint seine primäre Rolle in der Verstärkung oder Amplifikation („positives Feedback“) der Koagulation durch den Thrombin-Feedback Mechanismus auf FXI, FVIII und FV zu liegen (35, 68, 70).

2.1.3 Inhibitoren der Gerinnung

Ein wesentlicher Faktor innerhalb des Gerinnungsprozesses ist seine Regulation mittels natürlicher Antikoagulantia, die diesen auf den Bereich des Gefäßschadens begrenzt und durch die Prävention einer exzessiven und unkontrollierten Gerinnungsbildung die Durchgängigkeit der Blutgefäße garantiert (8, 14, 41).

Prinzipiell greifen verschiedene Mechanismen inhibitorisch in die Gerinnungsaktivität ein (11):

- 1) Ein durch den Blutstrom bedingtes Auswaschen aktivierter Gerinnungsfaktoren („Verdünnungseffekt“)
- 2) Eine Inaktivierung aktiver Faktoren durch im Blut zirkulierende Protease-Inhibitoren
- 3) Eine Hemmung durch zirkulierende Abbauprodukte des fibrinolytischen Systems (71–74)
- 4) Ein beschleunigter Abbau aktivierter Gerinnungsfaktoren (75).

Zu den Protease-Inhibitoren zählen unter anderem Antithrombin sowie der Heparin Kofaktor II, welcher Thrombin durch eine kovalente Komplexbildung inhibiert (76). Die in

der Leber synthetisierte Protease aktivierte Protein C (APC) ruft, unterstützt durch Protein S (77), eine Inhibition der Cofaktoren VIIIa und Va hervor (78). Weiterhin gehören die Faktoren Protein Z (79, 80, 81), welches im Zusammenspiel mit dem Protein Z-abhängigen Protease Inhibitor (ZPI) zu einer Inaktivierung von Faktor Xa führt (82), der tissue factor pathway inhibitor (TFPI) (29) und Thrombomodulin (25) (siehe 2.2.1 Endothel) sowie der α 1-Protease Inhibitor (α 1-Antitrypsin), welcher den Faktor XIa inaktiviert (83, 84), zu den physiologischen Inhibitoren der Gerinnung (18).

2.1.3.1 Antithrombin

Der Begriff Antithrombin wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts (85) als Überbegriff für anti-thrombotische Agentien, die zu einer gestörten Gerinnung und verlängerten Gerinnungszeiten führten, verwendet (86). Bei dem heutzutage als Antithrombin bezeichneten Plasmaprotein handelt es sich um ein α 2-Glykoprotein, das funktionell als Inhibitor von Serinproteasen wirksam ist (87, 88, 89). Neben der durch Komplexbildung hervorgerufenen Inhibition von Thrombin (24, 87) zeigt das überwiegend in der Leber synthetisierte Antithrombin ebenfalls eine inhibitorische Wirkung gegenüber den Faktoren Xa (88, 90), und in geringerem Ausmaß gegenüber den Faktoren IXa (91), XIa, XIIa und Plasmin (92) sowie den Substanzen Kallikrein und Trypsin (93), Gewebefibrinogen-Aktivator (tPA) und Urokinase (94). Insgesamt gilt Antithrombin als wichtigster Thrombin-Inhibitor (30, 40) und auch wichtigstes inhibitorisches Protein der Koagulation *in vivo* (7, 41).

Zudem weist Antithrombin anti-entzündliche Eigenschaften, die unter anderem in Zusammenhang mit seiner Interaktion mit den Endothelzellen stehen, wie zum Beispiel die durch eine Bindung von Antithrombin an Heparansulfate vermittelte Produktion des entzündungshemmenden Zytokins Prostazyklin (94). Auch kann Antithrombin bei verschiedenen Erkrankungen als prognostischer Marker verwendet werden (95).

Die inhibitorische Aktivität von Antithrombin wird durch das in der Leber synthetisierte Heparin (85), welches als sein Cofaktor und Katalysator wirkt, verstärkt und beschleunigt (85, 88, 96, 97). Heparin kann endogener (z. B. aus Mastzellen (98, 99)) oder exogener

Herkunft sein (40, 41). Weiterhin können die auf Endothelzellen befindlichen Heparansulfate die Antithrombin-Aktivität verstärken (100).

2.1.3.2 *Protein C*

Das 1976 erstmals beschriebene Protein C (101) ist ein Vitamin K-abhängiges Plasmaprotein (101), das im Plasma als inaktiver Vorläufer (Zymogen) einer Serinprotease (54, 102), dem aktivierten Protein C (APC) (103), zirkuliert. Diese Aktivierung wird durch Thrombin (104), welches an das endotheliale Oberflächenprotein Thrombomodulin gebunden ist, vermittelt (105, 106, 107). Eine weitere Rolle in der Aktivierung von Protein C spielt der endotheliale Protein C Rezeptor, welcher Protein C bindet und anschließend dem Thrombin-Thrombomodulin-Komplex präsentiert (106). APC weist eine antikoagulatorische Aktivität auf (54, 103), die in einer mittels Protein S verstärkten Inaktivierung der Faktoren Va (27) und VIIIa (108) besteht und somit eine Verminderung der Thrombingenerierung hervorruft (109). Dieser Weg zählt zu einem der wichtigsten regulatorischen Systeme der Gerinnung (110). Ebenfalls können die nicht aktivierten Formen von FV und FVIII durch APC inhibiert werden, jedoch in einem geringeren Ausmaß (106, 108). Für die Inaktivierung von FVa und FVIIIa wird weiterhin das Vorhandensein von Phospholipiden bzw. Phospholipid-haltigen Oberflächen und Calcium benötigt (108). Diese Inhibition findet insbesondere auf Endothelzelloberflächen und weniger auf Thrombozyten statt (109). Durch den Cofaktor Protein S wird die Affinität von Protein C zu negativ geladenen Phospholipid-Oberflächen verstärkt (27, 106).

Neben seiner antikoagulatorischen Aktivität weist APC *in vivo* profibrinolytische (103, 111) sowie auch anti-inflammatorische Eigenschaften (107) auf.

Inhibiert wird APC insbesondere durch den in der Leber synthetisierten Protein C Inhibitor, welcher einen 1:1 Komplex mit APC bildet, sowie durch α -1 Antitrypsin (106).

2.1.3.3 *Protein S*

Das Glykoprotein Protein S wurde erstmals 1977 von Di Scipio et al. (112) aus humanem und 1979 von Stenflo et al. (113) aus bovinem Plasma isoliert, wobei die Namensgebung nach dem Ort der Entdeckung erfolgte (S für Seattle) (112, 113). Walker entdeckte 1980,

dass dieses Vitamin K-abhängige Protein (77) einen Cofaktor für aktiviertes Protein C (APC) darstellt (77). Es beschleunigt in Anwesenheit von Phospholipiden die Inaktivierung von FVa durch APC (77). Dabei kann Protein S den Komplex aus FXa und FVa lösen, wodurch es APC ermöglicht wird, den FVa zu spalten (114).

Außerdem inhibiert Protein S APC-unabhängig die Prothrombinaseaktivität, indem es mit Prothrombin um die Bindungsstelle von FVa konkurriert (114). Protein S liegt im Plasma frei oder in einem Komplex mit C4-binding protein, einem Glykoprotein des Komplementsystems (115), gebunden vor (116).

Auch bei der Inaktivierung von FVIIIa durch APC wirkt Protein S stimulierend, stellt hier jedoch nicht den alleinigen Cofaktor dar, da ebenfalls die nicht aktivierte Form von FV synergistisch mit Protein S bei der Inaktivierung von FVIIIa mitwirkt (106).

Zudem führt Protein S APC-unabhängig zur Herabregulation der Gerinnung im Zusammenspiel mit TFPI auf phospholipidhaltigen Oberflächen (117, 118), indem es die Komplexbildung von FXa mit TFPI verstärkt und somit die durch den TF/FVIIa-Komplex katalysierte Aktivierung des FX inhibiert (117, 118, 119). Weiterhin wirkt Protein S ebenso wie Fibrinogen als Akute Phase Protein (67).

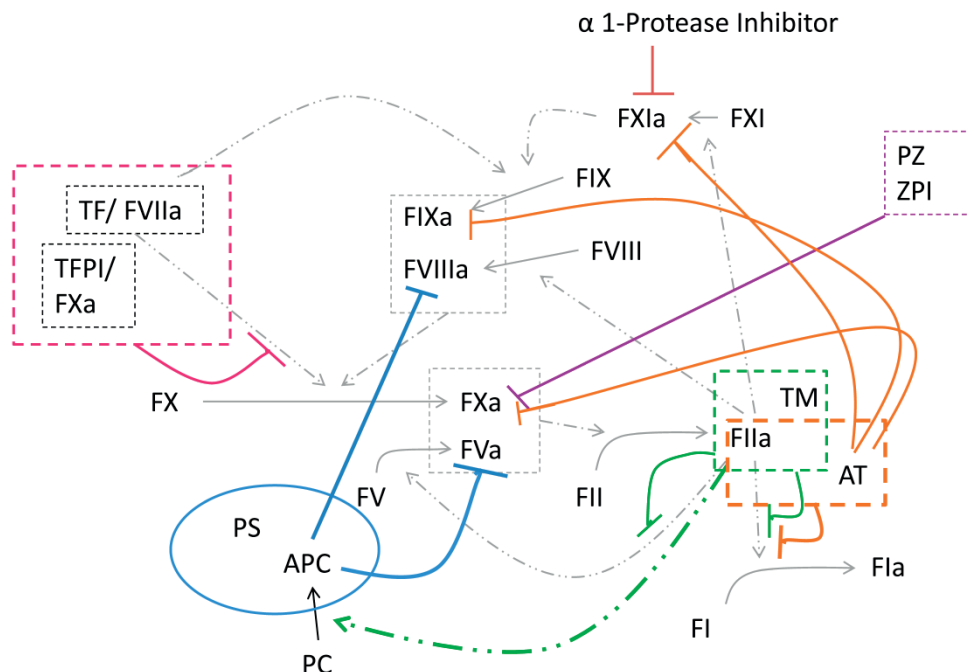


Abbildung 2: Modifizierung der Abbildung 1 mit Darstellung der Einwirkung der physiologischen Inhibitoren (bunt).

Die inhibitorische Wirkung wird mittels durchgezogenem Strich mit einem kurzen Querstrich am Ende (⊥) gezeigt, wobei der Querstrich an dem jeweils betroffenen Faktor oder Aktivierungsschritt (= gestrichelter Pfeil) endet. Sie kann von einzelnen Faktoren ausgehen (Strich beginnt am Faktor selber) oder von einem Komplex (Strich beginnt am Komplex). Die Komplexe sind durch eine bunt gestrichelte Umrandung dargestellt.

Abkürzungen: F = Faktor, PZ = Protein Z, ZPI = Protein Z-abhängiger Protease Inhibitor, TM = Thrombomodulin, PC = Protein C, APC = aktiviertes Protein C, PS = Protein S, TF = tissue factor (Gewebefaktor), TFPI = tissue factor pathway inhibitor, (I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI) = römische Ziffern, a = aktivierter

2.1.4 Tertiäre Hämostase/Fibrinolyse

Zeitgleich zur Gerinnungsbildung erfolgt eine Aktivierung des fibrinolytischen Systems, welches die Bildung des Gerinnsels limitiert und durch den Abbau von Fibrinablagerungen die physiologische Gefäßarchitektur wiederherstellt (10, 120). Zu diesem proteolytischen System zählen das Proenzym Plasminogen, das enzymatisch aktive Plasmin sowie die

Inhibitoren der Fibrinolyse, welche Plasmin neutralisieren oder die Aktivierung von Plasminogen beeinträchtigen können (120, 121, 122).

Plasminogen wird in das Gerinnsel eingebaut und liegt dort an Fibrin gebunden vor (120). Es kann durch verschiedene Arten von Aktivatoren aktiviert werden, von denen der Plasminogen-Aktivator vom Gewebetyp (t-PA) der wichtigste ist (63). T-PA wird wiederum durch das in der sekundären Hämostase entstandene Fibrin aktiviert (63). Weitere Aktivatoren von Plasminogen sind der Aktivator vom Urokinasetyp (u-PA) (123), der Faktor XIIa (124, 125) des intrinsischen Systems der sekundären Hämostase sowie Kallikrein (126). Das primäre Zielobjekt von Plasmin ist Fibrin (120) neben dem es andere Substrate wie Fibrinogen, Komplement oder Kasein umsetzen kann (127). Bei der Spaltung von Fibrin oder Fibrinogen entstehen verschiedene Fragmente (FDPs), von denen die D-Dimere, kreuzverknüpfte Fibrinogenfragment-D1 Moleküle (128), spezifisch sind für zuvor quervernetztes Fibrin (129).

Inhibiert wird das fibrinolytische System einerseits auf Höhe der Plasminogen-Aktivatoren durch Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI) oder auf Höhe des Plasmins durch Antiplasmin (130). Das an Fibrin gebundene Plasmin wird dabei im Gegensatz zum frei im Plasma vorkommenden Plasmin nur langsam durch Antiplasmin neutralisiert (120).

2.2 Defekte der sekundären Hämostase

Gerinnungsstörungen können angeboren oder erworben auftreten und dementsprechend weiter eingeteilt werden.

2.2.1 Angeborene Koagulopathien

Eine wichtige angeborene Koagulopathie der Katze stellt der autosomal-rezessive (131) Faktor XII-Mangel (Hageman Faktormangel) (132) dar. Dieser entspricht mit einer Prävalenz von ca. 2 % dem häufigsten bei Katzen auftretendem Faktormangel (133). Er tritt bei klinisch gesunden Katzen auf und führt *in vivo* nicht zu einer gesteigerten Blutungsneigung (134). Weitere bei Katzen auftretende angeborene Koagulopathien sind Hämophilie A (Faktor VIII-Mangel) (135, 136) und Hämophilie B (Faktor IX-Mangel) (137). Von diesen geschlechts-gebundenen rezessiv vererbten Erkrankungen sind überwiegend homozygote männliche Tiere betroffen, während heterozygote Weibchen

asymptomatische Träger sind (136, 138). Eine Kombination des Faktor IX-Mangels mit dem Faktor XII- Mangel (139) sowie eine Kombination des Faktor VIII-Mangels mit dem Faktor XII-Mangel (140, 141) ist bereits ebenfalls bei der Katze nachgewiesen worden. Weiterhin ist ein hereditärer Faktor XI- (142) und Faktor X- (143) Mangel bei der Katze beschrieben.

Im Gegensatz zu den bisher genannten Faktormangelzuständen, die sich in Blutungsneigungen äußern können, kann ein Mangel an Inhibitoren der Gerinnung in Form von gesteigerter Gerinnungsneigung oder Thrombosen in Erscheinung treten (3, 144). Ein angeborener Mangel der physiologischen Inhibitoren bei der Katze ist bisher noch nicht beschrieben. Aus der Humanmedizin ist jedoch bekannt, dass ein Mangel an Protein C (145, 146, 147, 148), Protein S (149, 150, 151) oder Antithrombin (94, 152, 153) ebenso wie ein Faktor V Leiden (154) zu Thrombosen oder einer Thromboseneigung führen kann. Bei einem Faktor V Leiden kommt es durch eine Punktmutation des den Faktor V kodierenden Gens zu einem verminderten Ansprechen auf aktiviertes Protein C (Resistenz gegen aktiviertes Protein C; APC-R) (155). In der Humanmedizin stellt diese Faktor V Mutation bzw. die daraus resultierende APC-Resistenz den am häufigsten auftretenden genetischen Risikofaktor einer Thrombose dar (156, 157). Fälle eines Faktor V Leidens sind in der Veterinärmedizin bis jetzt nicht beschrieben. Weiterhin ist in der Humanmedizin ein angeborener Plasminogenmangel beschrieben, der zu einer gesteigerten Thromboseneigung führen kann (158).

2.2.2 *Erworbene Koagulopathien*

Erworbene Koagulopathien können sich ebenso wie angeborene Koagulopathien in Blutungs- oder Gerinnungsneigungen manifestieren. Von einem labordiagnostischen Standpunkt aus muss dabei bedacht werden, dass *in vitro* auffällige Gerinnungszeiten nicht immer mit klinisch manifesten Blutungen assoziiert sind. So konnten bereits abnorme Gerinnungszeiten bei verschiedenen infektiösen (Lungenwurmlarven (159)), entzündlichen (inflammatory bowel disease, Cholangitis/Cholangiohepatitis, allergische Bronchitis) und neoplastischen (malignes Lymphom, neuroendokrine Tumoren) Erkrankungen nachgewiesen werden (160). Auch Lebererkrankungen können zu

abnormalen Gerinnungszeiten führen (160, 161, 162). Nur in wenigen Fällen wird dabei eine Blutungsneigung beobachtet (160, 162). Dies kann ursächlich darin begründet sein, dass Lebererkrankungen nicht die Gerinnungssituation *in vivo* widerspiegeln, bei der neben den prokoagulatorischen Faktoren der Gerinnung ebenfalls die natürlichen Inhibitoren (wie Protein C oder Antithrombin) vermindert sein können und somit die Balance der sekundären Hämostase aufrecht erhalten bleibt, wie aus der Humanmedizin bekannt ist (163, 164).

Die bei Hunden häufig auftretende Rodentizid-Intoxikation als Ursache einer Blutung mit labordiagnostisch verlängerten Gerinnungszeiten (PT und aPTT) tritt bei Katzen seltener auf, wurde jedoch in einem Fallbericht vermutet (165). Katzen, die an einer Infektion mit Feline Immunodefizienzvirus oder Feline Leukämievirus erkrankten, zeigen selten Blutungen oder labordiagnostisch verlängerte Gerinnungszeiten (166, 167).

Neuerdings werden immer häufiger thrombotische Komplikationen bei Erkrankungen beobachtet, die durch verschiedene, häufig multifaktorielle Mechanismen bedingt sein können (168). Bei Katzen wurden Thrombosen/Thrombembolien bereits beschrieben in Zusammenhang mit kardialen Erkrankungen (169, 170) bzw. Kardiomyopathien (171, 172, 173, 174), Neoplasien (169, 170, 171, 175), einer disseminierten intravasalen Gerinnung (169), Proteinverlust -Nephropathien (169) oder -Enteropathien (169), Pankreatitis (171), Lebererkrankungen (171, 176), Sepsis (169), immunvermittelter hämolytischer Anämie (169), feline infektiöse Peritonitis (171), Pneumonie (171), Glomerulonephritis (171), Enzephalitis (171) oder Hyperthyreose (168, 170).

Die labordiagnostische Evaluierung von Katzen, die eine Thrombembolie aufweisen, kann dabei unterschiedliche Ergebnisse liefern (normale (175, 177) oder verlängerte (176) Gerinnungszeiten; normale (176) oder erhöhte D-Dimer Werte (177); normale (176), erhöhte (178) oder verminderte (175) Fibrinogen-Konzentrationen; erhöhte Thrombin-Antithrombin-Komplex Werte (178); normale Antithrombin-Konzentrationen (176)).

Hinsichtlich der physiologischen Inhibitoren konnte in einer Studie eine signifikant niedrigere Antithrombin-Konzentrationen bei Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie verglichen mit gesunden Katzen (179) nachgewiesen werden. Die D-Dimer Werte, Thrombin-Antithrombin Komplex-Konzentrationen, PT und aPTT waren dabei nicht signifikant verändert zwischen den Gruppen (179). Diese Verminderung der

Antithrombin-Konzentration konnte in einer anderen Studie nicht bestätigt werden (178). Bei experimentell mit felinem infektiösen Peritonitis Virus inokkulierten Katzen konnte eine unveränderte Antithrombin-Konzentration gezeigt werden (180).

Daten zu den physiologischen Inhibitoren Protein C und Protein S sind bei Katzen bisher kaum vorhanden. Eine Studie bei Katzen mit Lebererkrankungen konnte bei 98 % der Katzen einen oder mehrere veränderte Parameter der Gerinnung nachweisen (181). Die Protein C-Aktivität war dabei in allen untersuchten Gruppen (Neoplasie, Entzündung, degenerative Erkrankung, Lipidose) signifikant niedriger als die einer gesunden Kontrollgruppe (181). Weiterhin konnte in einer Studie an Katzen mit Cytauxzoonose, deren Gerinnungstests mit einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) vereinbar waren, eine verminderte Aktivität von Protein C gezeigt werden, wohingegen die Antithrombin-Konzentration unverändert war (182).

Von Hunden ist bekannt, dass ein Protein-C-Mangel aufgrund eines erhöhtes Umsatzes oder Verbrauchs im Rahmen einer Entzündung, Sepsis oder DIC auftreten kann (183). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Patienten mit Sepsis niedrige Protein C- und Antithrombin- Aktivitäten aufwiesen, die ebenfalls mit dem klinischen Verlauf korrelierten (niedrigere Werte bei Patienten mit letalem Ausgang) (184). Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass die Therapie mit rekombinantem humanem aktivierten Protein C zu einer verminderten Mortalität bei schwerer Sepsis führen kann (144). Eine Aussage diesbezüglich konnte in der Studie von Katzen mit DIC aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht gemacht werden (182). Zudem ist bei Hunden mit portosystemischen Shunt bekannt, dass die Protein C-Konzentration als Biomarker der Leberfunktion und -perfusion genutzt werden kann (183).

In einer Studie an Hunden mit extrahepatischer Gallengangsobstruktion, welche zu einer Koagulopathie führen kann, wurde eine Hyperkoagulabilität als gesteigerte Gerinnungsneigung nachgewiesen (185). In dieser Studie zeigten die erkrankten Hunde teils eine verminderte oder selten eine erhöhte Protein C-Aktivität (185). Auch bei Hunden mit Proteinverlust-Nephropathie, bei denen eine Thrombose/ Thrombembolie eine Komplikation darstellt (186), konnten veränderte Protein C-Konzentrationen gemessen werden, die signifikant höher waren als die der gesunden Kontrollgruppe (186).

Aus der Humanmedizin ist weiterhin bekannt, dass die Protein S-Aktivität bei Lebererkrankungen und disseminierter intravasaler Gerinnung vermindert sein kann (187). Hyperthyreote Patienten zeigten in einer anderen Studie eine signifikante Erhöhung der Antithrombin-Konzentrationen verglichen mit einer Kontrollgruppe, wohingegen Protein C und Protein S keine Veränderungen zeigten (188). Zusätzlich ist aus der Humanmedizin bekannt, dass Patienten mit einer erhöhten Konzentration an vWF, FVIII oder FXI ein erhöhtes Risiko aufweisen eine Thrombose zu erleiden (189, 190).

2.3 Diagnostik

Die labordiagnostische Messung der sekundären Hämostase umfasst sowohl Screening Tests wie die Prothrombinzeit (PT), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und Thrombinzeit (TT) als auch die Erfassung einzelner Parameter und Faktoren (F) wie Fibrinogen, FXII, FVIII oder die APC-R Ratio. Die Screening Tests sind dabei als Suchtest eine Grundvoraussetzung für weitere Diagnostik wie eine Einzelfaktormessung (134).

Zudem können die Inhibitoren der sekundären Hämostase wie Protein C, Protein S und Antithrombin ermittelt werden. Als Parameter der tertiären Hämostase kann die Ermittlung der D-Dimer-Konzentrationen genutzt werden. Zur Überprüfung einer antithrombotischen Therapie mittels Heparin steht - neben der aPTT für Hoch-Molekulargewicht Heparine (191) - die Erfassung des anti-Faktors Xa für Niedrig-Molekulargewicht Heparine zur Verfügung (192, 193).

Die 1935 von Armand J. Quick (194) entwickelte Messung der Prothrombinzeit (PT) verwendet Thrombozyten-armes Plasma und ist definiert als die Zeit in Sekunden vom Start der Analyse, der durch die Zugabe von Gewebefaktor (Thromboplastin) und Calciumchlorid gekennzeichnet ist, bis zu dem Zeitpunkt, ab dem ein Gerinnsel optisch oder elektromechanisch detektiert wird (40, 195). Sie dient als Screening-Test des extrinsischen und gemeinsamen Gerinnungssystems (40).

Die 1953 erstmals beschriebene partielle Thromboplastinzeit (PTT) (196) ist eine modifizierte Form der Prothrombinzeit und ein Screening Test des intrinsischen und gemeinsamen Weges der Gerinnungskaskade (40). Dabei wird Citratplasma mit einem Überschuss an prokoagulatorischen Phospholipiden (als partielles Thromboplastin ohne

Gewebefaktor) und einem Oberflächenaktivator inkubiert. Durch Zugabe von Calciumchlorid setzt die Gerinnung ein, welche anschließend durch optische oder elektromechanische Methoden erfasst werden kann. Die Zeit von der Zugabe des Calciumchlorids bis zur Gerinnung entspricht der PTT bzw. der aPTT (40).

Früher (für die Messung der PTT) wurde eine Glasoberfläche als Aktivator genutzt. Heutzutage wird ein Aktivator (z. B. Kaolin (197)) zugesetzt, wodurch die Abkürzung aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) entstand (40, 197, 198).

Die Thrombinzeit (TT, TCT) ermittelt die Fibrinogen-Konzentration ebenso wie die Methodik nach Clauss (199), unterscheidet sich allerdings in den verwendeten Konzentrationen von Plasma und Thrombin (199). In der Methode nach Clauss, die in dieser Dissertationsarbeit zur quantitativen Bestimmung des Fibrinogens genutzt wurde, werden hohe Konzentrationen von Thrombin und verdünntes Plasma verwendet (199). Dieser Methode liegt die Kinetik der Thrombin-Fibrinogen-Reaktion zugrunde, wobei die Bildung eines Gerinnsels von der Menge und der Funktionalität des Fibrinogens abhängig ist (199). Neben der qualitativen Bestimmung des Fibrinogens durch die TT ist eine quantitative Erfassung mittels Hitzepräzipitation (200), wie 1971 von Millar et al. (201) beschrieben, möglich. Diese Methode ist allerdings inakkurat bei niedrigen Fibrinogen-Konzentrationen (8).

Zur Bestimmung der Einzelfaktor-Aktivität bzw. -Konzentration wird ein entsprechendes Mangelplasma als Reagenz benötigt, welches alle Faktoren im Überschuss enthält, bis auf den jeweils zu testenden Faktor (202). Das Patientenplasma kann anschließend mit einer Spezies-spezifischen Referenzkurve verglichen werden, wobei die Ergebnisse in Prozent (%) der Poolplasma-Aktivität angegeben werden.

Die Überprüfung einer Resistenz des Faktors V gegen aktiviertes Protein C (APC-R) kann mittels einer modifizierten aPTT erfolgen (154).

D-Dimere können als Zeichen einer Fibrinolyse genutzt werden als labordiagnostische Hilfe bei der Diagnose oder dem Ausschluss venöser Thrombembolien (8, 203). Es gibt verschiedene Tests zur Bestimmung der D-Dimere wie den Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Latex-Agglutinationstests oder immunturbidimetrische Methoden (8, 203).

Die Bestimmung der anti-Faktor Xa- Aktivität kann photometrisch wie zuvor beschrieben (204) erfolgen und wird häufig zur Kontrolle einer Heparintherapie bzw. zur Dosisanpassung angewandt (204).

2.4 Referenzintervallermittlung

Referenzintervalle bilden die Grundlage der Labordiagnostik, da sie zur Unterscheidung zwischen Gesundheit und Krankheit unterstützend herangezogen werden können (205). Die Referenzintervallermittlung kann direkt anhand von ausgewählten und gesunden Tieren einer Population oder indirekt anhand einer vorhandenen medizinischen Datenbank erfolgen, wobei die direkte der indirekten Methode vorzuziehen ist, da die indirekte Methode ebenfalls Werte kranker Individuen einschließt (206).

Die direkt de novo anhand von einer gesunden Population statistisch ermittelten Referenzintervalle (207) umfassen die mittleren 95 % der gemessenen Werte (207). Die für die Statistik verwendete Methode ist dabei abhängig von der Anzahl und der Verteilung der Werte, welche anhand von Histogrammen überprüft werden sollte (207).

Bei Gauss' scher Normalverteilung der Werte wird der Median und von diesem ausgehend nach oben und unten die 1,96 fache Standardabweichung der Datensätze berechnet, was ein Referenzintervall (RI) vom 2,5 Perzentil bis 97,5 Perzentil (und somit die mittleren 95 %) ergibt (205, 207). Falls keine Gauss'sche Normalverteilung vorliegt, können die Datensätze transformiert werden (z. B. mittels Logarithmieren) um eine Normalverteilung zu erreichen (207). Falls auch nach Transformation keine Normalverteilung erreicht werden kann, sollten generell nicht parametrische Methoden zur Referenzintervallerstellung genutzt werden (207).

Für nicht parametrische Methoden ist die Verteilung der Datensätze irrelevant, da sie die Daten sortieren und das 2,5 und 97,5 Perzentil zur Berechnung der mittleren 95 % der Werte nutzen (207). Der Einsatz nicht parametrischer Methoden ist allerdings erst ab 39 Datensätzen möglich und wird erst empfohlen, wenn mindestens 120 Datensätze zur Auswertung zur Verfügung stehen (207). Wenn zwischen 40 und 120 Datensätze zur Referenzintervallermittlung zur Verfügung stehen, werden Robust-Methoden auch trotz Abwesenheit einer Normalverteilung empfohlen (206, 207).

Konfidenzintervalle zeigen die Unsicherheit der errechneten Referenzintervall-Grenzen an und sind prinzipiell enger gefasst bei einer größeren Menge an Datensätzen (207, 208). Eine nicht parametrische Berechnung der 90 % Konfidenzintervalle der oberen und unteren Grenze ist ab einem Datensatz von über 120 Werten möglich (206). Wenn weniger als 120 Datensätze zur Referenzintervallermittlung vorhanden sind, sollten alternative Methoden (z. B. Bootstrap (206)) angewandt werden, um das 90%ige Konfidenzintervall zu bestimmen (207). Die Richtlinien der Amerikanischen Gesellschaft für klinische Labordiagnostik in der Veterinärmedizin (ASVCP Guidelines) (207) empfehlen dabei nach Harris und Boyd (209) – abgewandelt von Linnet (210) – einen Quotient aus der Weite des Konfidenzintervalls (WCI) und Referenzintervalls (WRI) zu ermitteln, der den Wert 0,2 nicht überschreiten sollte. Bei Überschreitung dieses Wertes sollten weitere Datensätze erhoben und in die Referenzintervallerstellung einbezogen werden (207).

Referenzintervalle für Screening Tests (162, 178, 211, 212, 213, 214, 215) der Gerinnung sowie für Fibrinogen (178, 214), Antithrombin (178, 213), D-Dimere (178, 179, 213), die FVIII-Aktivität (178), die FXII-Aktivität (216) und eine Basiskonzentration der anti-Faktor Xa-Aktivität (217, 218) wurden bei Katzen bereits ermittelt. Selten finden sich Referenzintervalle für Protein C der Katze (182). Auch wenn es Möglichkeiten gibt bereits bestehende Referenzintervalle zu übernehmen (207), wird im Allgemeinen empfohlen Geräte-, Methoden- und Spezies-spezifische Referenzintervalle innerhalb eines Labors zu erstellen, da durch die analytische (z. B. Zusammensetzung der Reagenzien, Methodik) und biologische Variabilität ein interlaboratorischer Vergleich nur eingeschränkt möglich ist (40, 195). Diesbezüglich sollten im Rahmen einer Referenzintervallerstellung oder zuvor im Rahmen einer Methodvalidierung Untersuchungen bezüglich der biologischen und analytischen Variabilität durchgeführt werden, welche die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen können (219) und die Auswahl der Ein- bzw. Ausschlusskriterien zur Referenzintervallerstellung definieren (206, 207).

Hinsichtlich der biologischen Variation gibt es intra-individuelle Unterschiede, die auch durch das Alter oder Geschlecht beeinflusst sein können, sowie inter-individuelle (z. B. auch Geschlechts-spezifische) Unterschiede, da die homöostatischen Regulierungen einzelner Individuen sich unterscheiden können (219).

Die analytische Variabilität umfasst die Berechnung der Impräzision (Zufallsfehler) und Ungenauigkeit (Systemfehler) einer Methode, welche den beobachteten Gesamtfehler (TE_{obs}) ergeben, sowie die Untersuchung des Einflusses von Interferenzen (206, 220, 221). Die Impräzision bezeichnet als zufälliger Fehler ein Unvermögen der Reproduzierbarkeit des selben Ergebnisses und wird in Form der Standardabweichung (SD) oder des Variationskoeffizienten (VC) berechnet (221, 222). Zur Ermittlung dieses zufälligen Fehlers eines Testverfahrens sollten Kurzzeit- (intra-assay) sowie Langzeit- (inter-assay) Replikationsstudien durchgeführt werden (220).

Als veterinärmedizinische Qualitätsanforderung kann die beobachtete Wiederholbarkeit (als SD oder VC) mit dem absolut zulässigen Gesamtfehler (TE_a) der Methode verglichen werden (221, 222) und sollte – nach den Richtlinien der ASVCP - unterhalb des TE_a liegen ($VC (\%) < TE_a (\%)$) (220). Angaben hinsichtlich des TE_a können dabei entweder einer Expertenmeinung entstammen oder aus Daten der biologischen Variation eines Parameters berechnet werden (222).

Werte für den TE_a sind insbesondere in der Humanmedizin für viele Laborparameter verfügbar (223, 224). Angaben für den TE_a in der Veterinärmedizin sind bis jetzt nur für Laborparameter der klinischen Chemie (222) und Hämatologie (225) veröffentlicht.

Daher wurde hinsichtlich der Akzeptabilität der durchgeführten Tests dieser Dissertationsarbeit der jeweils für den Menschen publizierte TE_a – falls vorhanden – als Vergleichsgröße verwendet (Quelle: www.westgard.com/biodatabase1.htm (224)).

Die systemische Ungenauigkeit wird in Form des Bias berechnet, welcher die Differenz (bzw. den Mittelwertsunterschied) zwischen dem gemessenen Ergebnis und einem bekannten Standard, wie bei einem Methodenvergleich verwendet, beschreibt (221, 222). Aus dem zufälligen und dem systemischen Fehler kann dann der insgesamt beobachtete Fehler berechnet werden: $TE_{obs} = 2 VC + Bias \%$ (222).

Auch hinsichtlich des Einflusses von interferierenden Substanzen kann der durch sie verursachte systemische Fehler in Form des Mittelwertsunterschied (Bias) von einer Kontrollsubstanz ermittelt werden (220). Auch hierbei gilt als veterinärmedizinisches Akzeptabilitätskriterium $Bias (\%) < TE_a (\%)$ (220). Auch hierfür wurden mangels veterinärmedizinischer Werte zur Beurteilung eines Einflusses interferierender

Substanzen humanmedizinische TE_a s – falls vorhanden – als Vergleichsgröße verwendet (Quelle: www.westgard.com/biodatabase1.htm (224)).

Eine Limitation bei der Verwendung von Referenzintervallen, die anhand einer gesunden Population erhoben wurden, ist die Individualität eines Analyten bzw. die unterschiedlichen Konzentrationen eines Analyten zwischen verschiedenen Individuen (inter-individuelle Variation > intra-individuelle Variation) (219, 226). Diese kann dazu führen, dass für eine Person oder ein Tier klinisch signifikante Veränderungen eines Analyten über einen Zeitraum nicht detektiert werden, da sie insgesamt innerhalb der konventionell anhand einer gesunden Population erhobenen Referenzintervalle liegen können (219). Um solche Veränderungen nicht zu übersehen, gibt es die Möglichkeit mit Hilfe der Daten der analytischen und biologischen Variation die kritische Differenz oder den Reference change value zu berechnen, welcher auf einer Interpretation von Laborergebnissen in Vergleich zu vorherigen Ergebnissen eines Patienten basiert und signifikante Änderungen innerhalb eines Individuums, die nicht zwingend das Referenzintervall über- oder unterschreiten müssen, aufzeigen kann (219).

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Diese prospektive Studie zur Referenzintervallermittlung ausgewählter Parameter der sekundären und tertiären Hämostase bei Katzen wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz in Nordrhein-Westfalen geprüft und unter dem Aktenzeichen 84-02.05.20.13.090 genehmigt sowie mit der Betriebs-internen Nummer 200a171 (Kategorie A; Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen) versehen.

Alle Analysen der Gerinnungs-Parameter sowie die Voruntersuchungen (August bis September 2014) erfolgten mit Hilfe des automatischen Gerinnungsanalysegerätes STA Compact® (Stago Germany, Düsseldorf, Deutschland). Zu den untersuchten Parametern zählt die Bestimmung von Gerinnungszeiten der häufiger verwendeten Screenings Tests (PT, aPTT und TT), der physiologischen Inhibitoren der Gerinnung (AT, Protein C und Protein S), der D-Dimere als Parameter der Fibrinolyse sowie eine Bestimmung der Konzentration bzw. Aktivität von Fibrinogen, FXII, FVIII, anti-FXa und der APC-R Ratio.

3.2 Probanden

Für die Referenzintervallerstellung wurden Blutproben von 62 klinisch gesunden Katzen der Rasse Europäisch-Kurzhaar der Bayer Animal Health GmbH (Leverkusen, Deutschland) untersucht. Zu diesen zählten 30 weibliche und 32 männliche Tiere. Diese Tiere waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme (Februar 2014, Juni 2014 oder September 2015) zwischen 10 und 22 Monaten alt mit einem Mittelwert von 16 Monaten.

Als Spezies-spezifisches Material zur Qualitätskontrolle wurden zudem zwei Probanden-Poolplasmen aus Blut von jeweils weiteren 10 Katzen der Bayer Animal Health GmbH gewonnen, bei denen es sich zusammen genommen um 12 männliche Katzen und acht weibliche Europäisch-Kurzhaarkatzen handelt, mit einem Alter zwischen 16 und 50 Monaten (Mittelwert von 26 Monaten).

Alle Tiere der Bayer Animal Health GmbH waren kastriert, geimpft und stammten vom selben Züchter (Liberty Research, Waverly, NY, US). Die Katzen waren seit mindestens zwei Wochen vor Ort und seit mindestens zwei Wochen in keiner anderen Studie

involviert. Gehalten wurden alle Tiere in Gruppenhaltung nach Geschlecht getrennt, mit Wasser ad libitum und Futter bedarfsgerecht nach Herstellerangaben des Futtermittels (Josera Léger, Adult light, Kleinheubach, Deutschland). Anhand von routinemäßigen klinischen Untersuchungen konnte der Gesundheitsstatus aller Katzen als gesund bestätigt werden.

Zusätzlich wurde ausschließlich für die Voruntersuchungen ein gepooltes Katzenplasma verwendet, das aus Citratplasmaresten bestand, die im Rahmen einer Gesundheitskontrolle von 7 klinisch gesunden Blutspendekatzen (Europäisch-Kurzhaar; 5 Tiere männlich kastriert, 2 Tiere weiblich kastriert) der Justus-Liebig-Universität Gießen gewonnen wurde.

3.3 Blutentnahme und Handling der Proben

Die Blutentnahmen und das weitere Handling der Proben erfolgten für alle Probanden vor Ort (Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Deutschland). Es wurden bei allen Probanden definierte Bedingungen eingehalten, um eine Vergleichbarkeit gewährleisten zu können und die präanalytische Variation zu minimieren (219).

Die Blutprobenentnahme erfolgte bei allen Katzen im nüchternen Zustand (> 12 Stunden keine Futteraufnahme). Zur Blutprobenentnahme wurde bei allen Katzen die linke oder rechte Vena cephalica antebrachii mit sterilen 21G Einmalkanülen (0,8x16,0mm, Neolus Nadel, Terumo, Eschborn, Deutschland) punktiert.

Bei der Blutentnahme zur Referenzintervallerstellung wurde das Blut aus den Kanülen tropfen gelassen (62 Katzen) und in 3,2 % Citratröhrchen (S-Monovette®, 3 ml, 9NC, Sarstedt, Wedel, Deutschland bei 41/62 Katzen oder S-Monovette®, 1,4 ml, 9NC, Sarstedt, Wedel, Deutschland bei 21/62 Katzen) aufgefangen bis die Röhrchen mit einem Mischungsverhältnis Blut:Citrat von 9:1 gefüllt waren. Sobald wie möglich erfolgte anschließend eine Zentrifugation (Eppendorf 58 10 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) des Citratblutes für 20 Minuten bei 2000 x g. Das abzentrifugierte Citratplasma wurde daraufhin in Aliquots von maximal 0,5 ml in Eppendorf Röhrchen® (Eppendorf Tubes® 3810 X, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verteilt. Diese wurden

aufrecht stehend in Gestelle verbracht und in diesen schnellstmöglich bei -80 °C tiefgefroren und so bis zum Versand vor Ort aufbewahrt.

Für die Herstellung des Probanden-Poolplasmas wurde von 2 x 10 Katzen jeweils ca. 8 ml Blut wie bereits für die Blutentnahme zur Referenzintervallerstellung beschrieben gewonnen, welches in 3,2 % Citratröhrchen (S-Monovette®, 10ml, 9NC, Sarstedt, Wedel, Deutschland) mit einem Mischungsverhältnis Blut:Citrat von 9:1 aufgefangen wurde. Dieses Citratvollblut wurde ebenfalls wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurde das Citratplasma von jeweils 10 Katzen in ein sauberes Gefäß pipettiert und durch gründliches Schwenken ein Pool hergestellt. Dieses gepoolte Plasma konnte daraufhin in Portionen von 0,5 ml in Eppendorf Röhrchen® (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei -80 °C tiefgefroren werden.

Der Versand der Proben zum Ort der Messungen erfolgte mit Flüssigstickstoff, um den tiefgefrorenen Zustand der Proben gewährleisten zu können. Nach Ankunft wurden die Proben wieder unverzüglich bei -80 °C gelagert. Die Analysen erfolgten innerhalb eines Jahres nach Probenentnahme im Zentrallabor des Fachbereiches Veterinärmedizin (FB 10) in Zusammenarbeit mit dem Laborpersonal.

3.4 Voruntersuchungen

Da es sich bei dem verwendeten Gerinnungsanalysator sowie den Geräte-spezifischen Reagenzien um für die Humanmedizin entwickelte Produkte handelt, musste aufgrund möglicher Spezies-spezifischer Unterschiede (227, 228) zunächst die Validität der Tests für die Katze überprüft werden. Dafür erfolgte eine Doppelmessung aller zu untersuchenden Parameter aus dem Probanden-Poolplasma mit den Standardeinstellungen des Analysators für humanes Plasma. Die Resultate wurden mit den Angaben der humanen Qualitätskontrolle im normalen Level des Herstellers (Stago) verglichen. Im Falle von vergleichbaren Messergebnissen wurde weiterführend der humane Test verwendet, falls starke Abweichungen vorlagen, wurde der Test für die Katze angepasst.

Diese Anpassung beinhaltete anstatt einer Verwendung der humanen Standardkurve eine Spezies-spezifische Kalibrationskurve, die anhand einer seriellen Verdünnung von

Katzenpoolplasma erstellt wurde. Die Aktivität der Faktoren im Poolplasma galt dabei als 100 % und die Plasmen aller Katzen wurden im Vergleich zu diesem Poolplasma gemessen. Die feline Standardkurve wurde mit vier seriellen Verdünnungsstufen erstellt und hinsichtlich der Verwendbarkeit der Verdünnungen diente eine optische Überprüfung der Linearität unter Zuhilfenahme des Korrelationskoeffizienten nach Pearson, bei dem der Wert 1 bzw. -1 als optimal galt. Diese Standardkurve wurde mit gepooltem Katzenplasma aus Citratplasmaresten der Blutspendekatten der Justus-Liebig-Universität Gießen erstmalig kalibriert. Im Laufe der Messungen dieser Dissertationsarbeit wurden vor Einsatz einer neuen Charge an Reagenzien die Kalibrationen mit gepooltem Citratplasma des Probanden-Pools (von Katzen der Bayer Animal Health GmbH) unter Verwendung der gleichen Verdünnungsstufen wiederholt und die Linearität der Messungen überprüft.

3.5 Methodik der Messungen am STA Compact®

3.5.1 Allgemeines

Die Messungen der ausgewählten Parameter der sekundären und tertiären Hämostase erfolgten am vollautomatischen Gerinnungsanalysegerät STA Compact® (Stago Germany, Düsseldorf, Deutschland). Die Proben- und Kontrollgefäße sowie die Reagenzien werden bei diesem Gerät manuell eingebracht, wohingegen die weitere Aufbereitung der Proben, die Analyse und eine Übermittlung der Ergebnisse automatisiert erfolgen.

Das zu testende Plasma wird dazu automatisch mittels einer von drei Nadeln in eine Küvette innerhalb des Inkubationsareals pipettiert. Je nach anstehendem Test werden zuvor oder anschließend Reagenzien dazu pipettiert, um die Gerinnung zu starten. Die Messung der Gerinnung erfolgt innerhalb des Mess-Areals, das Plätze für vier Küvetten und somit Platz für vier Patientenproben beinhaltet. Je nach zu messendem Gerinnungsparameter erfolgt die Analyse nach einem von zwei Messprinzipien:

i. Chronometrische Messung:

Diese Methode beruht auf dem Prinzip einer durch den Start der Gerinnung induzierten Änderung der Viskosität des Testplasmas. Diese wird durch eine Veränderung der Bewegungen eines innerhalb der Küvette befindlichen und mittels elektromagnetischer

Felder in Schwingung versetzen Stahl-Balles detektiert, dessen Bewegungen abhängig von der Viskosität des Plasmas sind. Eine konstante Viskosität des Plasmas führt zu konstanten Bewegungen des Balls. Eine Steigerung der Viskosität hingegen führt zu einer verlangsamen Bewegung des Balls und somit zu einer kleineren Oszillationsamplitude. Die Gerinnungszeit wird schließlich durch einen Algorithmus anhand der Variationen dieser Amplituden ermittelt (STA Compact® Operator's Manual (229)). Dieses Messprinzip wurde zur Messung der TT, PT, aPTT, APC-R sowie der Aktivität von FXII, FVIII, PC und PS verwendet.

ii. Photometrische Messung:

Diese Methode basiert auf der Absorption eines monochromatischen (405 oder 540 nm) Lichts, das durch die Küvette geleitet wird, in der eine chromogene Reaktion stattfindet. Das in die Küvette eingeleitete Licht wird teils absorbiert und teils transmittiert, wobei das weitergeleitete Licht anschließend gemessen und in Absorption konvertiert wird. Diese Absorption wird mittels des Beer-Lambert Gesetzes in die Konzentration der zu testenden Substanz konvertiert (STA Compact® Operator's Manual (229)). Dieses Messprinzip wurde zur Messung von Antithrombin und der anti-FXa-Aktivität verwendet.

3.5.2 Spezielle Tests

Vor der Durchführung der einzelnen Tests zur Referenzintervallerstellung wurden die bei -80 °C tiefgefrorenen Citratplasma-Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für 10 Minuten bei 850 x g zentrifugiert.

Vor den Messungen des Plasmas der einzelnen Katzen erfolgten an jedem Messtag interne Qualitätskontrollen mittels Reagenzien des Herstellers. Dabei wurden jeweils eine normale und eine pathologische Kontrolle verwendet (STA-QUALI-CLOT I und II (DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich) für PT, aPTT, TT, Fibrinogen und Antithrombin; STA-QUALITY HBPM/LMWH (DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich) für anti-Faktor Xa; STA LIATEST CONTROL N+P (DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich) für die Messung der D-Dimere; die im Reagenz STA-STACLOT® APC-R (DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich) enthaltenen Kontrollen (Control N und Control P) für APC-R).

Als Qualitätskontrolle für FXII, FVIII sowie Protein C und S, welche mittels Katzen-spezifischer Kalibrationskurve gemessen wurden (siehe 3.4 Voruntersuchungen), diente Probanden-Poolplasma in Form einer Normal-Kontrolle (unverdünntes Plasma) und einer Niedrig-Kontrolle (1:1 mit steriler Natriumchlorid-Lösung verdünntes Plasma), aus denen an jedem Messtag eine Messung dieser Parameter erfolgte.

3.5.2.1 *PT, aPTT, TT, Fibrinogen und APC-R*

Die Screening Tests PT, aPTT und TT sowie die Messung der APC-R, einer durch Zugabe von aktiviertem Protein C modifizierten aPTT (154), wurden chronometrisch unter Verwendung kommerzieller Reagenzien (STA- NEOPLASTINE® CI PLUS, STA- C.K. PREST® 5, STA- THROMBIN, STA- STACLOT® APC-R; DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich) bestimmt und die Ergebnisse in Sekunden angegeben. Die Einstellungen der minimalen und maximalen Messzeit betrugen für die PT 3 zu 120 Sekunden, für die aPTT 6 zu 180 Sekunden, für die TT 8 zu 240 Sekunden und für die APC-R 20 zu 300 Sekunden. Der Minimalwert von 8 Sekunden für die Thrombinzeit wurde aus einer vorherigen Studie an Hunden übernommen (227).

Die Berechnung der APC-R Ratio erfolgte nach folgender Formel (230):

$$APC - R \text{ Ratio} = \frac{APC - R}{aPTT} = \frac{aPTT \text{ unter Zugabe von aktiviertem Protein C}}{\text{Standard aPTT}}$$

Die Fibrinogen-Konzentration wurde quantitativ mittels Clauss-Methode unter Verwendung eines vom Hersteller angebotenen humanen Standard-Plasmakalibrators (STA- FIBRINOGEN 5, DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich) bestimmt.

3.5.2.2 *Faktor VIII, Faktor XII, Protein C und Protein S*

Die Analyse der Aktivitäten von FVIII und FXII erfolgte mittels eines Substratplasmas, in dem der jeweils zu untersuchende Faktor fehlt (STA-DEFICIENT VIII und STA-IMMUNODEFXII, Stago Germany, Düsseldorf, Deutschland) und nur durch das Patientenplasma zugeführt wird. Die so mittels eines modifizierten aPTT-Tests gemessene Gerinnungszeit wurde mit den Ergebnissen der aus seriell verdünntem Katzenpoolplasma

Material und Methoden

erstellten Standardkurve (siehe 3.4 Voruntersuchungen) verglichen, wobei unverdünntem Poolplasma eine Gerinnungsaktivität von 100% zugesprochen wurde. Für FVIII erfolgte bei dieser automatisierten Messung eine Vor-Verdünnung der Patienten-Probe von 1:50 mit Verdünnungspuffer und für FXII eine Verdünnung von 1:10.

Die quantitative Erfassung der Aktivität von Protein C und Protein S erfolgte ebenfalls chronometrisch mittels eines automatisierten Gerinnungstests (STA- STACLOT® PROTEIN C und STA- STACLOT® PROTEIN S, DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich). Dabei wurden jeweils 50 µl der Probe mit der Pufferlösung (OWREN-KOLLER, DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich) im Verhältnis 1:5 automatisiert vor-verdünnt.

Zur Messung von Protein C wurden der Probe lyophilisiertes Protein C-freies Humanplasma und ein als Aktivator von Protein C dienendes hochgereinigtes, getrocknetes Extrakt aus dem Gift der Schlange Agkistrodon contortrix (Nordamerikanischer Kupferkopf) zugefügt.

Die so induzierte Aktivierung von Protein C resultiert in einer Hemmung der Faktoren V und VIII. Da alle anderen benötigten Faktoren durch das Humanplasma im Überschuss vorhanden sind, kann durch eine der Bestimmung der aPTT indirekt durch eine Verlängerung der Gerinnungszeit die Aktivität von Protein C gemessen werden. Der Anstieg der aPTT ist dabei direkt proportional zur Protein C-Aktivität. Durch Vergleich der aus seriell verdünntem Katzenpoolplasma angefertigten Standardkurve wird die prozentuale Protein C-Aktivität des getesteten Katzenplasmas ermittelt, wobei die Protein-Aktivität in unverdünntem Katzenpoolplasma als 100 % gilt. Die Überschreitung einer Protein C-Aktivität > 150 % in der zu analysierenden Probe, resultierte in einer automatischen Wiederholungsmessung mit einer Vor-Verdünnung von 1:20.

Die Bestimmung der Protein S-Aktivität erfolgte ähnlich dem Protein C, wobei der antikoagulatorische Effekt von Protein C hierbei durch den Cofaktor Protein S verstärkt wurde. Dem zu analysierenden Citratplasma wurden dafür jeweils 50 µl lyophilisiertes Protein S-freies Humanplasma, lyophilisiertes aktiviertes humanes Protein C und eine lyophilisierte Zubereitung mit bovinem Faktor Va zugesetzt. Die Ergebnisse wurden mit

der Standardkurve aus feline Poolplasma verglichen und in % angegeben, wobei Messungen > 150 % automatisch mit einer Vor-Verdünnung von 1:20 wiederholt wurden.

3.5.2.3 *Antithrombin und anti-Faktor Xa*

Die Bestimmung der Antithrombin-Aktivität erfolgte kolorimetrisch über seine Hemmwirkung auf Thrombin, wobei Ergebnisse in % verglichen mit einem humanen Standard-Plasmakalibrator angegeben wurden (STA- STACHROM® AT III 3, DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich). Dieses Testsystem verläuft in zwei Schritten, wobei zunächst 100 µl des 1:20 mit OWREN-KOLLER (DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich) verdünnten Plasmas unter Zugabe von lyophilisiertem Rinderthrombin, das zu einem bekannten Thrombinüberschuss führt, 60 Sekunden in Gegenwart von Heparin inkubiert wird. Anschließend wird das verbleibende Thrombin quantitativ chromogen bestimmt. Da die im ersten Schritt neutralisierte Menge von Thrombin proportional zum im Plasma vorhandenen Antithrombin ist, kann der Schluss gezogen werden, dass das restliche Thrombin des zweiten Schrittes umgekehrt proportional zur Antithrombin-Konzentration im untersuchten Plasma ist.

Die Messung der anti-Faktor Xa-Aktivität erfolgte ebenfalls photometrisch mittels eines automatischen Gerinnungstests unter Verwendung eines im Test-Kit (STA- LIQUID ANTI-Xa 4, DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich) beinhalteten chromogenen Substrates (100 µl) und eines Reagenz mit bovinem Faktor Xa (100 µl). Es wurden 100 µl des zu testenden Plasmas mit OWREN-KOLLER 1:4 verdünnt (DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich). Sobald der Faktor Xa zu der Plasma-Substrat-Mischung gegeben wurde, erfolgten zwei zeitgleich ablaufende Reaktionen: Eine Hydrolyse des chromogenen Substrates S2732 zu dem photometrisch messbaren Paranitroanilin durch überschüssigen Faktor Xa, der nicht durch das in der zu analysierenden Patienten-Plasmaprobe vorhandene Heparin inaktiviert wurde. Die nach einer Inkubationszeit von 240 Sekunden freigesetzte Menge von Paranitroanilin als chromogene Komponente konnte dann photometrisch bestimmt werden und war umgekehrt proportional zu der im Plasma vorhandenen Heparin-Konzentration des Patienten. Die Ergebnisse wurden in UI/ml angegeben. Die Kalibration erfolgte mittels

STA®- MULTI HEP CALIBRATOR (DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich).

3.5.2.4 *D-Dimere*

Die D-Dimer-Konzentration wurde mittels STA- LIATEST® D-DI PLUS Kit (DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich) immunturbidimetrisch bestimmt. Dabei führen spezifisch gegen D-Dimere gerichtete Antikörper, die an Latex-Mikrosphären kovalent gebunden sind, bei Kontakt mit den im Patientenplasma (eingesetzt in einer Menge von 50 µl, 1:1 mit OWREN-KOLLER (DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich) vor-verdünnt) vorhandenen D-Dimeren zu einer Antigen-Antikörperreaktion und zeitgleich zu einer Agglutination der Mikrosphären. Dies erhöht die Trübung der Mischung und somit die optische Dichte, wobei die Amplitude der Erhöhung von der im Testplasma enthaltenen D-Dimer-Menge abhängig ist. Die Trübungserhöhung wird photometrisch gemessen und die Menge an D-Dimeren in µg/ml angegeben.

3.6 Untersuchungen

3.6.1 *Replikationsstudien (Wiederholbarkeit)*

Neben den Untersuchungen zur Referenzintervallerstellung erfolgten Messungen hinsichtlich der analytischen Variation. Dafür wurden zur Abschätzung des Zufallsfehlers bzw. der Präzision eine Kurzzeit-Replikationsstudie (intra-assay Variation) sowie eine Langzeit-Replikationsstudie (inter-assay Variation) durchgeführt.

Für die Bestimmung des Zufallsfehlers über einen kurzen Zeitraum (intra-assay) wurde bei -80 °C tiefgefrorenes Poolplasma von Probandenkatzen bei Raumtemperatur aufgetaut, 10 Minuten bei 850 x g zentrifugiert und das in Aliquots befindliche Plasma wieder in einem Pool zusammengeführt. Aus diesem Pool erfolgten dann 10-fach wiederholte Messungen sowie eine Erhebung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten dieser zehnfachen Messungen.

Zur Bestimmung des Zufallsfehlers über einen längeren Zeitraum (Langzeit-Replikationsstudie; inter-assay Variation) wurden die Ergebnisse der Qualitätskontrollen

der Tage, an dem Einzelkatzen zur Referenzintervallermittlung gemessen wurden, genutzt (siehe 3.5.2). Für die mittels der (humanen) Standardeinstellungen gemessenen Parameter wurden die Ergebnisse der Qualitätskontrolle (Reagenzien des Herstellers) im normalen Level verwendet. Für die inter-assay Variation der Parameter Faktor VIII und XII sowie für Protein C und S, welche mittels Katzen-spezifischer Kalibration gemessen wurden (siehe 3.4 Voruntersuchungen), wurden die Ergebnisse der unverdünnten Normalkontrolle genutzt. Das Probanden-Poolplasma für die Qualitätskontrolle von FVIII und FXII sowie für Protein C und Protein S wurde wie für die Kurzzeit-Replikation beschrieben behandelt.

3.6.2 Interferenzen

Der Einfluss einer Lipämie oder Hämolyse auf die Ergebnisse wurde zur Evaluierung des systemischen Fehlers überprüft (220). Hierfür wurde ein an das empfohlene Protokoll der American Society of Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) (220) angenähertes Verfahren genutzt. Wie empfohlen (220) wurde Poolplasma verwendet, das nachdem alle Messungen der Studie abgeschlossen waren, aus den noch vorhandenen Citratplasmaresten der Einzelkatzen hergestellt wurde. Die Citratplasmareste von Tieren, welche für die Referenzintervallerstellung ausgeschlossen wurden (1 Katze), wurden hier ebenfalls nicht verwendet. Das bis dahin bei -80 °C gelagerte Citratplasma der einzelnen Tiere wurde bei Raumtemperatur aufgetaut, 10 Minuten zentrifugiert bei 850 x g und der Überstand in ein steriles Schraubröhrchen (10ml Röhre, 97x16 PS, Sarstedt) pipettiert. Der durch gründliches Schwenken vermengte Pool wurde anschließend in dem Probengefäß für 10 Minuten bei 850 x g erneut zentrifugiert. Aus diesem Pool wurden dann Testplasmen mit unterschiedlicher Konzentration an der für die Interferenzmessungen zu untersuchenden Störsubstanz wie folgt hergestellt:

Zur Überprüfung einer Lipämie wurde ein hochgradig lipämisches Plasma (A) und ein geringgradig lipämisches Plasma (B) mittels Zugabe einer definierten Menge Lipovenös (Lipovenös® 20 %, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) sowie eine Kontrolle angefertigt.

Material und Methoden

Für A wurden 100 µl Lipovenös® zu 1,9 ml Poolplasma gegeben, so dass diese Lösung eine Verdünnung von 1:19 (Lipovenös®:Poolplasma) und somit eine Sojabohnenöl-Konzentration von 10mg/ml aufwies.

Für B wurde eine Grundlösung hergestellt aus 250 µl Lipovenös® und 750 µl steriler Natriumchlorid-Lösung (Natriumchlorid – Trägerlösung Baxter, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim). Von dieser Grundlösung wurden dann 100 µl zu 1,9 ml Poolplasma gegeben, so dass B eine Verdünnung von 1:76 (Lipovenös®:Poolplasma) und eine Sojabohnenöl-Konzentration von 2,5 mg/ml aufwies.

Die Kontrolle bestand ebenfalls aus 1,9 ml Poolplasma, dem anstatt der interferierenden Substanz 100 µl sterile Natriumchlorid Lösung zugegeben wurde. Die drei Ansätze (A, B und Kontrolle), die jeweils 2 ml Lösung ergaben, wurden durch mehrfaches Schwenken gründlich vermennt und anschließend in je zwei Eppendorf-Röhrchen® à 1 ml aufgeteilt (2x A (LIPO TEST 1:19 und LIPO TEST 1:19 1) mit je 1 ml, 2x B (LIPO TEST 1:76 und LIPO TEST 1:76 1) mit je 1 ml, 2x Kontrolle (KONTR. LIPO und KONTR. LIPO 1) mit je 1 ml). Aus jedem Röhrchen erfolgten dann einfache Messungen, so dass insgesamt Doppelmessungen der jeweiligen Testansätze zur Auswertung zur Verfügung standen.



Abbildung 3: Fotografie der 3 zur Lipämie-Interferenzmessung verwendeten Verdünnungen.

Links zu sehen ist das hochgradig lipämische Plasma (A), mittig das geringgradig lipämische Plasma (B) und rechts die Kontrolle.

Die Überprüfung der durch Hämolyse vermittelten Interferenzen erfolgte ebenfalls mittels zwei verschiedenen Verdünnungsstufen unter Verwendung eines kommerziell

erhältlichen Hämoglobins (Hemoglobin from bovine blood (H2500-1G), lyophilized powder, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), wobei 1 Gramm in 10 ml steriler Natriumchlorid-Lösung (Natriumchlorid – Trägerlösung Baxter, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) aufgelöst wurde, um so eine Hämoglobin-Konzentration von 100 mg/ml zu erzielen (Standardhämoglobin Lösung).

Von dieser wurden 100 µl zu 1,9 ml Poolplasma gegeben um ein hochgradig hämolytisches Plasma (a) herzustellen. Dieses wies eine Verdünnung von 1:19 (Hämoglobin:Plasma) und eine Hämoglobin-Konzentration von 5 mg/ml auf.

Für ein geringgradig hämolytisches Plasma (b) wurden 250 µl der Standardhämoglobinlösung zu 750 µl der Natriumchlorid Lösung gegeben und von dieser Lösung anschließend 100 µl genommen und zu 1,9 ml Poolplasma gegeben, was in einer Verdünnung von 1:76 (Hämoglobin:Plasma) und einer Hämoglobinkonzentration von 1,25 mg/ml resultierte.

Die Kontrolle bestand auch hier aus 1,9 ml Poolplasma, zu dem 100 µl der Natriumchlorid Lösung gegeben wurde.

Auch hier wurden die drei Ansätze (a, b und Kontrolle), die ebenfalls jeweils 2 ml Lösung ergaben, nach durch mehrfaches Schwenken gründlichem Vermengen der Proben in je zwei Aliquots à 1 ml in Eppendorf-Röhrchen® aufgeteilt. Wie bei der Überprüfung der Lipämie erfolgten hier ebenfalls einfache Messungen aus jeden Röhrchen, so dass bei jedem Testansatz insgesamt zwei Messungen durchgeführt wurden.



Abbildung 4: Fotografie der 3 Verdünnungen der Hämolyse-Interferenzmessung.

Links ist die hochgradig hämolytische Probe (a), mittig die geringgradig hämolytische Probe (b) und rechts die Kontrolle sichtbar. Gut zu erkennen ist, wie die gestrichelten Linien im Hintergrund durch die Kontrolle und b gut zu sehen sind, wobei sie bei a nur undeutlich zu erkennen sind, was Anzeichen einer hohen Trübung ist.

Im Falle einer Divergenz eines Parameters bei Messungen innerhalb eines Probenansatzes wurde eine zweite Messung durchgeführt.

3.6.3 Stabilität der Proben

Die von Bauer et al. (230) für Citratplasma von Hunden nachgewiesene Probenstabilität bei Lagerungen bei -80 °C sollte ebenfalls für die Katze untersucht werden. Dazu wurden von zwei Katzen (2/62), deren Plasma zur Referenzintervallerstellung genutzt wurde, vier Monate nach den Messungen zur Referenzintervallerstellung („Erstmessung“) Doppelmessungen aller Tests („Zweitmessung“) durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Erstmessung war das Plasma bereits 7 Monate gelagert, so dass der Unterschied in den Ergebnissen nach 7 Monaten Lagerung zu 11 Monaten Lagerung untersucht wurde.

3.6.4 Referenzintervallerstellung

Für die Messungen zur Referenzintervallerstellung wurde jeweils das in Portionen von 0,5 ml tiefgefrorene Citratplasma von 6 bis 8 Katzen bei Raumtemperatur aufgetaut, die Plasmaproben anschließend 10 Minuten bei 850 x g zentrifugiert und das Plasma jeweils eines Tieres in Eppendorf Röhrchen® (Eppendorf Tubes® 3810X, 1,5 ml) mittels Pipettierens zusammengeführt. Aus diesen erfolgten dann die Messungen in der nachfolgenden Reihenfolge: Faktor VIII, Faktor XII, Protein C, Protein S, PT, aPTT, Antithrombin, TT, Fibrinogen, D-Dimere, aFXa, APC-R.

Folgende Kriterien wurden zum Ausschluss eines Ergebnisses oder eines Tieres aus der Referenzintervallermittlung festgelegt:

- Makroskopisch hämolytisches oder lipämisches Plasma
- Jedes Messergebnis, das die Messgrenzen des Gerätes über- oder unterschritt

- Wenn ≥ 3 Testergebnisse eines Tieres die Messgrenzen des Gerätes über- oder unterschritten, waren ebenfalls die Ergebnisse aller anderen Parameter dieses Tieres auszuschließen.
- Ausreißer (hoch oder tief) waren zunächst erneut zu messen und bei Bestätigung des extremen Wertes („Ausreißer“) nur dann auszuschließen, wenn der Abstand des extremen Wertes zum nächst größten (wenn hoher Extremwert) oder nächst kleinsten Wert (wenn niedriger Extremwert) $\frac{1}{3}$ der Verteilungsbreite (Range) aller Werte ausmachte oder überschritt (231).

Ob Ausreißer vorhanden waren, wurde während der statistischen Auswertung optisch sowie nach Tukey (in der Software zur Referenzintervallerstellung beinhaltet (232)) festgelegt. Jeder Ausreißer wurde, sofern noch Citratplasma der jeweiligen Katze vorhanden war, innerhalb eines Jahres ein zweites Mal gemessen. Falls diese zweite Messung den Wert der ersten Messung bestätigte, wurde der Wert der ersten Messung für die Statistik genutzt. Falls der Wert der Nachmessung deutlich von der ersten Messung abwich, wurde eine dritte Messung direkt angeschlossen und sofern diese den Wert der zweiten Messung bestätigte, aus diesen zwei Werten der Nachmessungen der Mittelwert gebildet und für die weitere Statistik genutzt.

Als Maß der Sicherheit der unteren und oberen Grenzen der Referenzintervalle wurden die Konfidenzintervalle ermittelt (207). Weiterhin wurde zur Überprüfung, ob eine ausreichende Anzahl an Proben zur Referenzintervallermittlung herangezogen wurde, nach Harris und Boyd (209) – modifiziert von Linnet (210) - der Quotient aus der Weite des Konfidenz- (WCI) und Referenzintervalls (WRI) gebildet. Als nicht sicher galten die ermittelten Referenzintervalle aufgrund ungenügend hoher Anzahl an Tieren dann, wenn der Quotient den Wert 0,2 überschritt (209, 210).

3.6.5 Geschlechtervergleich

Hinsichtlich eines Einflusses des Geschlechts auf die Messergebnisse wurden die inkludierten Katzen, die alle zum Zeitpunkt der Untersuchung kastriert waren, nach Geschlechtern eingeteilt und die Ergebnisse verglichen. Bei signifikanten Unterschieden wurde weiterhin der Mittelwertsunterschied berechnet, der wie von Sinton et al. (1986)

Material und Methoden

beschrieben erst bei einer Überschreitung über 25 % des Referenzintervalls eine klinische Relevanz des statistischen Unterschiedes nachweist.

4. Statistik

Die vom STA Compact® Analysator elektronisch angezeigten Ergebnisse wurden manuell in eine Excel-Tabelle (Microsoft-Excel 2010) zur weiteren statistischen Auswertung übertragen, wobei die Referenzintervallerstellung mit Hilfe des Software-Programms Reference Value Advisor 2.1 (Biostatistiques, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Frankreich (232)) erfolgte.

4.1 Replikationsstudien (Wiederholbarkeit)

Die Wiederholbarkeit und somit die Präzision über einen kurzen Zeitraum (intra-assay) wurde durch zehnfach wiederholte Messungen aus demselben Ansatz Probanden-Poolplasma unter Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten (220) innerhalb der Probe (intra-assay) ermittelt. Die Berechnung der Variationskoeffizienten (VC) erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Variationskoeffizient (\%)} = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \times 100 \quad (233)$$

Die Reproduzierbarkeit über einen längeren Zeitraum (inter-assay) wurde durch die Ergebnisse der Qualitätskontrollen jeden Messtages (n = 6) bestimmt unter Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten.

Als akzeptable Leistung in der Reproduzierbarkeit galten Testergebnisse, die unterhalb des absolut zulässigen Fehlers (TE_a) lagen (VC (%) < TE_a (%)) (220). Dabei wurde ein in der Humanmedizin publizierter TE_a – falls vorhanden – verwendet (Quelle: www.westgard.com/biodatabase1.htm (224)).

4.2 Interferenzen

Der absolute und prozentuale Mittelwertsunterschied aus den Doppel-Messungen eines jeweiligen Probenansatzes (hochgradige Lipämie (A), geringgradige Lipämie (B) bzw. hochgradige Hämolyse (a), geringgradige Hämolyse (b)) zur Kontrolle wurde hinsichtlich des Einflusses der interferierenden Substanzen bestimmt (220). Der prozentuale

Mittelwertsunterschied - synonym prozentualer Bias (220, 222, 234) - kann wie folgt berechnet werden:

$$\text{Bias (\%)} = \frac{\text{Ziel Mittelwert (Kontrolle)} - \text{gemessener Mittelwert (mit Interferenz)}}{\text{Ziel Mittelwert (Kontrolle)}} \times 100 \quad (233)$$

Als Qualitätsrichtlinie für ein akzeptables Ergebnis d. h. eine fehlende, relevante Interferenz wurde der durch die Interferenzanalyse gemessene systemische Fehler in Form des Bias (in %) mit dem – sofern vorhanden - für den Menschen publizierten absolut zulässigen Fehler (TE_a) verglichen (Quelle: www.westgard.com/biodatabase1.htm (224)), wobei Bias (%) < TE_a (%) sein sollte (220).

4.3 Stabilität der Proben

Der absolute und prozentuale Unterschied zwischen der „Erstmessung“ und des Mittelwertes der „Zweitmessung“ (siehe 3.6.3) zweier Katzen wurde berechnet hinsichtlich des Einflusses einer Lagerung über einen Zeitraum von vier Monaten. Anschließend wurde aus diesen Werten der Mittelwert berechnet. Als Qualitätskriterium wurde eine Abweichung von < 10 % vom Ausgangswert festgelegt.

4.4 Referenzintervallerstellung

Die Referenzintervalle wurden mit Hilfe des Software-Programms Reference Value Advisor 2.1 (Biostatistiques, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Frankreich (232)) erstellt. Zunächst wurde dafür die Datenverteilung gemäß ASVCP Richtlinien (207) mit Beurteilung der Histogramme und QQ-Plots der Rohdaten und der nach Box-Cox transformierten Daten auf Normalverteilung geprüft und diese mittels Anderson-Darling Test bestätigt.

Für Parameter, die anhand nicht transformierter Daten oder nach Box-Cox Transformation eine Normalverteilung aufwiesen, wurde entsprechend der ASVCP Richtlinien eine Robust-Methode zur Referenzintervallerstellung verwendet (207). Dies schließt die TT, PT, aPTT, APC-R Ratio und FVIII ein. AT und FXII zeigten nach Transformation ebenfalls eine Normalverteilung auf, allerdings wurde dennoch eine nicht parametrische Methode zur Referenzintervallermittlung genutzt, da die untere

Referenzintervallgrenze bei der Robust-Methode den kleinsten gemessenen Wert unterschritt.

Sollte auch nach Box-Cox Transformation keine Normalverteilung erreicht worden sein, wurde ein nicht-parametrisches Prinzip zur Referenzintervallerstellung verwendet (aFXa, D-Dimere, Fibrinogen). Die Referenzintervalle für die Parameter Protein C und Protein S wurden ebenfalls durch eine nicht parametrische Methode bestimmt.

Der Mittelwert, Median, die Minimal- und Maximalwerte sowie die Standardabweichung wurden anhand von nicht transformierten Daten berechnet.

Sollten während der statistischen Auswertung optisch sowie nach Tukey (in der Software zur Referenzintervallerstellung beinhaltet (232)) einzelne Ausreißer aufgefallen sein, wurde mit diesen wie bei 3.6.4 beschrieben verfahren.

4.5 Geschlechtervergleich

Ein möglicher Einfluss des Geschlechts auf die Referenzintervalle wurde unter Verwendung der Software GraphPad Prism 7.02 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA 92037 USA) ermittelt. Dafür wurde zunächst auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test geprüft. Anschließend wurde ein ungepaarter t-Test für normal verteilte Daten (APC-R Ratio, FVIII, FXII) oder Mann-Whitney Test für nicht normal verteilte Daten (TT, PT, aPTT, AT, PC, PS, Fibrinogen, D-Dimere, aFXa) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf $p < 0,05$ festgelegt. Weiterhin wurde bei signifikanten Unterschieden zwischen den Geschlechtern die klinische Relevanz dieses Unterschieds getestet, von welcher wie bei Sinton et al. (1986) beschrieben erst auszugehen war bei einem Mittelwertsunterschied, der 25 % des Referenzintervalls überschritt.

5. Ergebnisse

5.1 Voruntersuchungen

Die Ergebnisse der Messungen von Katzenpoolplasma unter Verwendung der humanen Standardkurve bzw. der humanen Standardeinstellungen sind in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 1) dargestellt.

	TT (Sek)	PT (Sek)	aPTT (Sek)	AT (%)	Fib (mg/dl)	APC- R (Sek)	D-Dim (µg/ml)	FXII (%)	FVIII (%)	PC (%)	PS (%)
1. Messung	15,8	13,1	12,6	131	138	39,3	0,22	479	4132	-26	-23
2. Messung	15,9	13,1	12,3	130	137	38,1	0,22	538	3841	-26	-23
Hersteller- angabe (Range der Normal- kontrolle)	14 – 20	11,5 – 16	25 – 34	84 – 113	195 – 320	137 – 185	0,1 – 0,5	74 – 107	85 - 118	88 – 120	71- 100

Tabelle 1: Ergebnisse der Messungen aus dem Katzenpoolplasma mit den Einstellungen der humanen Standardkurve im Vergleich zu den Herstellerangaben der Normalkontrolle.

Valide Messungen ergaben sich für die TT, PT und die D-Dimere, deren Ergebnisse im Bereich der vom Hersteller angegebenen Werte der Normalkontrolle lagen.

Die Messungen der aPTT, von AT, Fibrinogen und der APC-R unterschieden sich von der beim gesunden Menschen zu erwartenden Aktivitäten dieser Parameter (aPTT: um 50 % kürzer; AT: ca. 20 % höher; Fibrinogen: ca. 30 % niedriger; APC-R: ca. 70 % niedriger (*diese Angaben beziehen sich auf den unteren oder oberen Wert des Bereichs der humanen Normalkontrolle, je nachdem ob aus dem feline Poolplasma verminderte oder erhöhte Werte gemessen wurden*)), allerdings konnte keine Anpassung dieser Tests erfolgen, da es sich um Präkalibrationen (Fibrinogen) des Herstellers oder einen unveränderbaren Roh-

Modus (aPTT, APC-R) der Einstellungen handelt. Antithrombin wird standardmäßig im Vergleich zu einer durch serielle Verdünnung eines humanen Kalibrators erstellten Standardkurve gemessen. Im Falle deutlicher Abweichungen zwischen der humanen und feline Antithrombinaktivität könnte anstelle des humanen Kalibrationsmaterials Katzenpoolplasma verwendet werden. Hier wurden die Unterschiede zwischen der Antithrombin-Aktivität von Katze und Mensch als geringgradig eingestuft und somit wurde zum besseren Vergleich mit anderen Studien auf eine Modifizierung verzichtet und der humane Kalibrator verwendet.

Die Messung von Faktor XII mit der humanen Kalibration ergab eine ca. vierfach erhöhte Aktivität im Vergleich zu dem humanen Kalibrationsmaterial und die Messung von Faktor VIII eine etwa vierzigfache erhöhte Aktivität. Die Messungen von Protein C und Protein S ergaben Werte im negativen Bereich (Protein C: -26 %; Protein S: -23 %), was auf eine verglichen mit dem Menschen hochgradig verminderte Aktivität dieser Faktoren hinweist. Aufgrund dieser Abweichungen von FXII, FVIII und der Inhibitoren Protein C und Protein S wurde für diese Parameter eine Spezies-spezifische Standardkurve erstellt. Hierfür wurden verschiedene serielle Verdünnungsstufen aus Poolplasma von sieben Katzen zur Optimierung der Standardkurve (Tabelle 2) getestet, wobei ein Korrelationskoeffizient nahe 1 bzw. -1 als Ausdruck der Linearität angestrebt wurde.

Ergebnisse

Test	Verdünnungsstufen	Korrelationskoeffizient nach Pearson
Faktor VIII	1:20, 1:50, 1:100, 1:200	-0,938
	1:50, 1:100, 1:200, 1:400	-0,926
	1:10, 1:20, 1:40, 1:80	-0,951
	1:20, 1:40, 1:80, 1:160	-0,955
	1:40, 1:60, 1:80, 1:100	1. Messung: -0,988 2. Messung: -0,974
Protein S	1:5, 1:10, 1:20, 1:40	-0,971
	1:10, 1:20, 1:40, 1:80	-0,998
Protein C	1:5, 1:10, 1:20, 1:40	-0,957
	1:10, 1:20, 1:40, 1:80	-0,982
Faktor XII	1:80, 1:40, 1:20, 1:10	-0,999
	1:10, 1:20, 1:40, 1:80	-0,999

Tabelle 2: Für die Kalibrationen getestete Verdünnungsreihen mit resultierendem Korrelationskoeffizient.

Die grau hinterlegten Verdünnungsreihen wurden weiterführend für die entsprechenden Kalibrationen genutzt.

Die resultierenden Kalibrationskurven waren annähernd linear. Bei Verwendung einer neuen Charge von Reagenzien (nach den Messtagen 3 und 5 der Referenzintervallerstellung bzw. für die Messungen zur Methodvalidierung (Wiederholbarkeit, Interferenzen, Stabilität)) wurden jeweils erneute Kalibrationen mit den festgelegten Verdünnungsreihen unter Verwendung von Poolplasma, das von 10 Katzen der Bayer Animal Health GmbH gewonnen wurde, durchgeführt. Die resultierenden Korrelationskoeffizienten für die Messtage 4 und 5 waren -0,982 für Protein C, -0,992 für Protein S, -0,998 für Faktor XII und -0,987 für Faktor VIII. Am Messtag 6 wurden folgende Korrelationskoeffizienten gemessen: Protein C: -0,987; Protein S: -0,996; Faktor XII: -0,998; Faktor VIII: -0,974.

Im Gegensatz zu allen oben beschriebenen Tests konnte die Messung von aFXa (Messungen: 0,00 und -0,00 UI/ml) nicht mit den Angaben des Herstellers verglichen werden, da hierfür heparinisiertes Katzenblut hätte verwendet werden müssen.

5.2 Replikationsstudien (Wiederholbarkeit)

Die intra-assay Variationskoeffizienten (Kurzzeit-Replikation) lagen für die meisten Werte bei ≤ 3 %. Auffällig waren der Variationskoeffizient der D-Dimer-Messung (18 %) und der Variationskoeffizient von anti-Faktor Xa (200 %).

Mittelwert, Standardabweichung und der Variationskoeffizient der einzelnen Tests der Kurzzeit-Replikationsstudie (intra-assay) und Langzeit-Replikation (inter-assay) sind in Korrelation mit dem zulässigen Gesamtfehler in Tabelle 3 dargestellt.

Ergebnisse

Test	MW (intra- assay)	SD (intra- assay)	Intra- assay Variations- koeffizient (%)	MW (inter- assay)	SD (inter- assay)	Inter- assay Variations- koeffizient (%)	Zulässiger Gesamtfehler (TE _a (%)), Mensch (224)*
TT (Sek)	16,3	0,25	1	17,9	0,61	3	Keine Angabe
PT (Sek)	10,3	0,18	2	14,4	0,84	6	5,3
aPTT (Sek)	12,9	0,12	1	32,7	1,68	5	4,5
Protein C (%)	126,9	1,52	1	126,8	9,84	8	18,7
Protein S (%)	138,8	3,26	2	143,5	30,77	21	20,7
FVIII (%)	89,3	3,27	3	79,5	10,15	13	8,9
FXII (%)	105,2	0,03	3	100	7,04	7	Keine Angabe
AT (%)	132,1	0,26	3	110,2	6,21	6	8,3
APC-R (Sek)	30,5	0,21	1	150,8	37,34	25	Keine Angabe
APC-R Ratio (keine Einheit)	2,4	0,03	1	4,6	1,09	24	Keine Angabe
Anti-FXa (UI/ml)	0,0	0,00	200	0,8	0,04	5	Keine Angabe
D-Dimere (µg/ml)	0,2	0,04	18	0,3	0,02	8	28,04
Fibrinogen (g/l)	1,6	0,08	5	2,7	0,21	7	13,6

Tabelle 3: Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizienten (VC) der Wiederholbarkeitsmessungen (intra-assay VC in hellgrau, inter-assay VC in mittelgrau) der untersuchten Parameter.

Fett markiert sind Variationskoeffizienten, welche das Qualitätskriterium (Zulässiger Gesamtfehler TE_{α} , dunkelgrau) überschreiten.

** Zugang über <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>*

Abkürzungen: MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, TT = Thrombinzeit, PT = Prothrombinzeit, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, F = Faktor, AT = Antithrombin, APC = aktiviertes Protein C, APC-R = Resistenz gegen aktiviertes Protein C

Für die Parameter PT, aPTT, TT, AT, Fibrinogen, D-Dimere und aFXa lag der inter-assay Variationskoeffizient unter 10 %.

Die Messergebnisse der Normalkontrollen für die Tests, die unter Zuhilfenahme einer Katzen-spezifischen Kalibration durchgeführt wurden (FVIII, FXII, Protein C, Protein S), als Grundlage der Langzeit-Replikationsstudie sind als Verlaufsdiagramm in der nachfolgenden Abbildung (Abbildung 5) aufgeführt.

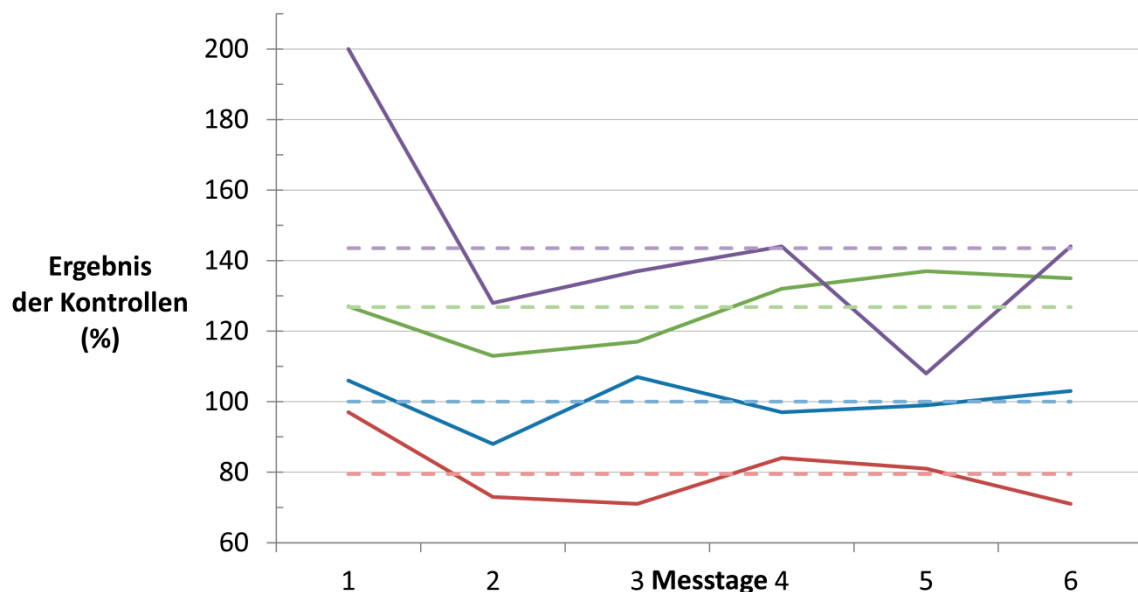


Abbildung 5: Aktivität der Normalkontrolle der Parameter Faktor XII, Faktor VIII, Protein C und Protein S gemessen aus dem Probanden-Poolplasma an den einzelnen Messtagen.

Die Aktivität der Normalkontrolle von Faktor XII ist blau dargestellt, Faktor VIII rot, Protein C grün und Protein S lila. Die Mittelwerte der Kontrollen sind gestrichelt und in einem helleren Farbton der gleichen Farbe aufgeführt: Faktor XII (hellblau), Faktor VIII (hellrot), Protein C (grau-grün), Protein S (fliederfarben).

Ergebnisse

Die Messergebnisse von Faktor XII schwankten dabei immer um 100 % (106 %, 88 %, 107 %, 97 %, 99 %, 103 %) bei einem Mittelwert von 100 % mit einer Standardabweichung von 7 % und einem Variationskoeffizienten von 7 %.

Die Werte der Kontrollmessungen von Faktor VIII lagen konstant unterhalb von 100 % (97 %, 73 %, 71 %, 84 %, 81 %, 71 %) mit einem Mittelwert von 79,5 %, einer Standardabweichung von 10 % und einem Variationskoeffizienten von 13 %.

Protein C zeigte Werte, die konstant oberhalb von 100 % lagen (127 %, 113 %, 117 %, 132 %, 137 %, 135 %) mit einem Mittelwert von 126,8 %, einer Standardabweichung von 10 % und einem Variationskoeffizienten von 8 %.

Die Werte der Kontrollmessungen von Protein S zeigten die größten Schwankungen mit Werten zwischen 108 % und 200 % (200 %, 128 %, 137 %, 144 %, 108 %, 144 %), einem Mittelwert von 143,5 %, einer Standardabweichung von 31 % und einem Variationskoeffizienten von 21 %.

5.3 Interferenzen

Die Ergebnisse der Interferenz-Messungen und somit die Einflüsse einer Lipämie (Tabelle 4) und Hämolyse (Tabelle 5) sind nachfolgend tabellarisch dargestellt. Dabei zeigte der Grad der Lipämie oder Hämolyse einen Einfluss auf die Höhe der Abweichungen.

Test (Einheit)		PT (Sek)	aPTT (Sek)	TT (Sek)	APC-R (Sek)	APC- R Ratio	D-Dimere (µg/ml)	AT (%)	Fibrinogen (g/l)	aFXa (UI/ml)	PC (%)	PS* (%)	FVIII (%)	FXII (%)
Testansatz	Kontr.	KONTR. LIPO 1	10,9	12,6	16,9	35,0	0,09	162	1,44	0,08	136	224	77	90
		KONTR. LIPO 2	10,9	12,5	16,5	33,5	0,24	138	1,43	0,04	136	144	71	87
		x ⁻	10,9	12,55	16,7	34,25	0,165	150	1,435	0,06	136	184	74	88,5
A	LIPO 1:19 1	TEST 10,8	12,6	16,7	33,3	2,64	**	145	1,43	**	136	254	76	87
	LIPO 1:19 2	TEST 10,9	12,5	16,3	33,8	2,70	**	146	1,44	**	136	148	75	91
	x ⁻	10,85	12,55	16,5	33,55	2,67	***	145,5	1,435	***	136	201	75,5	89
	Δ	0,05	0	0,2	0,7	0,04	***	4,5	0	***	0	17	1,5	0,5
	Bias† (%)	0,46	0,00	1,20	2,04	1,48	***	3,00	0,00	***	0,00	9,24	2,03	0,56
B	LIPO 1:76 1	TEST 10,8	12,5	16,8	34,1	2,73	0,53	142	1,44	0,01	136	148	74	90
	LIPO 1:76 2	TEST 10,7	12,4	17,2	34,3	2,77	0,48	147	1,37	0,00	137	189	74	91
	x ⁻	10,75	12,45	17	34,2	2,75	0,505	144,5	1,405	0,005	136, 5	168,5	74	90,5
	Δ	0,15	0,1	0,3	0,05	0,04	0,34	5,5	0,03	0,055	0,5	15,5	0	2
	Bias† (%)	1,38	0,80	1,80	0,15	1,48	206,06	3,67	2,09	91,67	0,37	8,42	0,00	2,26
TE _a (%) (224)		5,3	4,5	k. A.	k. A.	k. A.	28,04	8,3	13,6	k. A.	18,7	20,7	8,9	k. A.

Ergebnisse

Tabelle 4: Einfluss einer Lipämie auf die Messergebnisse.

Hellgrau hinterlegt und kursiv geschrieben sind die Mittelwerte, während der Mittelwertsunterschied (Bias) jeweils mittelgrau hinterlegt sind. Dunkelgrau hinterlegt ist der absolut zulässige Fehler (TE_a), welcher als Limit hinsichtlich einer Interferenz herangezogen wurde. Fett markiert sind Werte, welche dieses Limit überschritten und deren Messungen somit durch die interferierende Substanz beeinflusst wurden.

A = hochgradig lipämisches Plasma, B = geringgradig lipämisches Plasma

\bar{x} = arithmetisches Mittel, Δ = absolute Differenz zur Kontrolle

\dagger = Bias entspricht dem prozentualen Unterschied zwischen der Kontrolle und dem jeweiligen Testansatz (233, 234)

** = Aufgrund der Differenz innerhalb eines Testansatzes (Unterschied innerhalb der Kontrolle, A und B) erfolgte eine zweite Messung, welche die dargestellten Ergebnisse bestätigte*

*** = „technischer Fehler“, Ergebnisse wurden nicht angezeigt*

**** = aufgrund des Fehlens von Werten ist eine Berechnung nicht möglich*

Da die Messung von Protein S innerhalb der lipämischen Testansätze (A und B) und der dazugehörigen Kontrolle deutliche Unterschiede zeigte, erfolgte eine Wiederholung der Messung, welche die zuerst gemessenen Ergebnisse bestätigte. Diese Differenz innerhalb der Ansätze konnte außer bei Protein S nur bei dem für den Einfluss der Lipämie verwendeten Kontrollansatz von Antithrombin nachgewiesen werden

Testansatz \ Test (Einheit)		PT (Sek)	aPTT (Sek)	TT (Sek)	APC-R (Sek)	APC-R Ratio	D-Dimere (µg/ml)	AT (%)	Fibrinogen (g/l)	aFXa (UI/ml)	PC (%)	PS (%)	FVIII (%)	FXII (%)
Kontr.	KONTROLLE HB 1	11,0	12,5	17,1	33,0	2,64	0,09	139	1,46	0,04	137	145	75	89
	KONTROLLE HB 2	10,8	12,4	17,2	32,5	2,62	0,21	145	1,48	0,04	142	150	75	90
	–	10,9	12,45	17,15	32,75	2,63	0,15	142	1,47	0,04	139,5	147,5	75	89,5
	x													
A	HB 1:19 1	10,7	12,3	17,7	32,8	2,67	0,45	130	1,39	-0,11	136	148	75	91
	HB 1:19 2	11,0	12,4	17,7	32,4	2,61	0,42	129	1,37	-0,08	135	148	79	91
	–							129,5			135,5			
	x	10,85	12,35	1,7	32,6	2,64	0,435	5	1,38	-0,095	5	148	77	91
	Δ	0,05	0,1	0,55	0,15	0,01	0,285	12,5	0,09	0,135	4	0,5	2	1,5
	Bias† (%)	0,46	0,80	3,21	0,46	0,38	190,00	8,80	6,12	337,5	2,87	0,34	2,67	1,68
B	HB 1:76 1	10,7	12,6	16,9	31,0	2,46	0,27	139	1,43	0,01	144	140	79	95
	HB 1:76 2	10,9	12,3	16,8	30,8	2,50	0,21	134	1,43	0,00	142	150	75	95
	–							136,5						
	x	10,8	12,45	16,85	30,9	2,48	0,24	5	1,43	0,005	143	145	77	95
	Δ	0,1	0	0,3	1,85	0,15	0,09	5,5	0,04	0,035	3,5	2,5	2	5,5
	Bias† (%)	0,92	0,00	1,75	5,65	5,70	60,00	3,87	2,72	87,50	2,51	1,69	2,67	6,15
TE _a (%) (224)		5,3	4,5	k. A.	k. A.	k. A.	28,04	8,3	13,6	k. A.	18,7	20,7	8,9	k. A.

Ergebnisse

Tabelle 5: Einfluss einer Hämolyse auf die Messergebnisse.

Hellgrau hinterlegt und kursiv geschrieben sind die Mittelwerte, während die Abweichungen jeweils mittelgrau hinterlegt sind. Dunkelgrau hinterlegt ist der absolut zulässige Fehler (TE_a), welcher als Limit hinsichtlich einer Interferenz herangezogen wurde. Fett markiert sind Werte, welche dieses Limit überschritten und deren Messungen somit durch die interferierende Substanz beeinflusst wurden.

a = hochgradig hämolytisches Plasma, b = geringgradig hämolytisches Plasma

\bar{x} = arithmetisches Mittel, Δ = absolute Differenz zur Kontrolle

\dagger = Bias, entspricht dem prozentualen Unterschied zwischen der Kontrolle und dem jeweiligen Testansatz (233, 234)

5.4 Stabilität der Proben

Die Ergebnisse der Messungen zur Überprüfung der Probenstabilität, ermittelt durch eine vergleichende Messung nach 7 und 11 Monaten Lagerungszeit, sind in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 6) dargestellt. Als akzeptabel wurden Abweichungen zwischen den Durchläufen von unter 10 Prozent definiert. Eine über 10-prozentige Abweichung konnte für die Parameter Antithrombin, D-Dimere, anti-Faktor Xa und Protein C ermittelt werden.

Katze \ Test (E.)	PT (Sek)	aPTT (Sek)	TT (Sek)	AT (%)	Fibrinogen (g/l)	D-Dimere (µg/ml)	aFXa (UI/ml)	APC-Ratio (einheitslos)	Prot C (%)	Prot S (%)	FVIII (%)	FXII (%)
Katze 1, 1. Messung	10,3	12,4	16,2	123	1,42	0,23	0,02	2,77	127	242	86	78
Katze 1, 2. Messung	10,3	12,9	17,5	147	1,40	0,12	0,07	2,77	147	240	85	84
Δ (abs.)	0,0	0,5	1,3	24	0,02	0,11	0,05	0,0	20	2	1	6
Δ (%)	0,0	4,0	8,0	19,5	1,4	47,8	250,0	0,0	15,8	0,8	1,2	7,7
Katze 2, 1. Messung	11,0	11,2	14,7	133	1,18	0,23	0,05	3,48	123	263	80	82
Katze 2, 2. Messung	10,7	12,0	15,4	166	1,32	0,27	0,05	3,23	143	287	79	83
Δ (abs.)	0,3	0,8	0,7	33	0,14	0,04	0,0	0,25	20	24	1	1
Δ (%)	2,7	7,1	4,8	24,8	11,9	17,4	0,0	7,2	16,3	9,1	1,3	1,2
\bar{x} (Δ Katze 1 und 2; abs.)	0,15	0,65	1,0	28,5	0,08	0,08	0,03	0,13	20,0	13,0	1,0	3,5
\bar{x} (Δ Katze 1 und 2; %)	1,4	5,6	6,4	22,2	6,6	32,6	125,0	3,59	16,0	5,0	1,2	4,5

Tabelle 6: Ergebnisse des Lagerungsversuchs von Citratplasma zweier Einzelkatzen.

Angegeben sind absolute und prozentuale Abweichungen zwischen Erstmessung und Messung nach 4 Monaten bei -80° C. Die prozentuale Abweichung bezieht sich auf die Erstmessung. In Fettbuchstaben dargestellt sind Abweichungen, die über zehn Prozent hinausgehen.

Δ = Differenz zwischen den Messungen, \bar{x} = arithmetisches Mittel

Abkürzungen: E. = Einheit, TT = Thrombinzeit, PT = Prothrombinzeit, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, AT = Antithrombin, aFXa = anti-Faktor Xa, APC-R = Resistenz gegen aktiviertes Protein C, F = Faktor

5.5 Referenzintervalle

Nach den festgelegten Ausschlusskriterien wurde 1/62 Katzen komplett von der Referenzintervallermittlung ausgeschlossen, da über 3 Parameter die Nachweisgrenzen des automatischen Analysegerätes unter- oder überschritten und keine Angabe eines Zahlenwertes erfolgte.

Bei einer weiteren Katze (1/62) wurden die Nachweisgrenzen zur Bestimmung von APC-R unterschritten, was zum Ausschluss dieses Ergebnisses führte. Auch die Aktivität des FXII wurde nach den angegebenen Kriterien (siehe 3.6.4) bei dieser Katze als Ausreißer erkannt, und daher ausgeschlossen (FXII (%): 1. Messung: 179, 2. Messung: 178; Verteilungsbreite der anderen 60 Katzen: 61-137).

Alle weiteren während der statistischen Auswertung aufgefallenen Ausreißer bestätigten sich nicht bei den Nachmessungen oder erfüllten nicht die Ausschlusskriterien und wurden daher weiterhin zur Referenzintervallermittlung eingeschlossen.

Hinsichtlich der Messungen des anti-FXa wurden bei drei Katzen negative Werte (geringgradig unter Null) angezeigt. Aus Gründen der Logik wurden diese Werte auf 0,0 gesetzt.

Die Ergebnisse der mittels Katzen-spezifischer Kalibration gemessenen Parameter (PC, PS, FVIII, FXII) wurden im Vergleich zur Aktivität des Poolplasmas (auf 100 % festgelegt) angegeben, wobei der Pool dabei aus Plasma von 10 Katzen bestand. Das gepoolte Plasma der anderen 10 Katzen wurde von den Messungen ausgeschlossen, da es hämolytisch war.

Ergebnisse

Die ermittelten Referenzintervalle einschließlich ihrer Konfidenzintervalle sowie die Median- und Mittelwerte aller untersuchten Parameter sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 7) zusammengefasst:

Test	Einheit	N	RI	90 % CI unten	90 % CI oben	Spann- breite	Median	Mittel- wert
TT	Sek	61	14,1 – 19,6	13,9 – 14,3	18,7 – 20,5	14,0 – 19,6	16,0	16,0
PT	Sek	61	10,1 – 12,5	10,0 – 10,2	12,1 – 13,0	9,9 – 12,9	10,9	11,0
aPTT	Sek	61	10,8 – 14,1	10,5 – 11,1	13,7 – 14,4	10,8 – 14,9	12,3	12,3
APC-R Ratio	-	60	2,0 – 3,7	1,8 – 2,2	3,5 – 3,9	1,78 – 4,07	2,8	2,9
PC	% felines Pool- plasma	61	103 – 385	95 – 111	315 – 400	95 – 400	127	147
PS	% felines Pool- plasma	61	88 – 388	71 – 112	334 – 417	71 – 417	230	217
AT	% humaner Standard	61	112 – 162	111 – 117	157 – 164	111 – 164	133	135
FVIII	% felines Pool- plasma	61	56 – 124	51 – 61	117 – 131	52 – 134	86	88
FXII	% felines Pool- plasma	60	62 – 131	61 – 67	122 – 137	61 – 137	86	92
aFXa	UI/ml	61	0,0 – 0,1	0,0 – 0,0	0,1 – 0,1	0,0 – 0,1	0,1	0,0
D- Dimere	µg/ml	61	0,0 – 0,4	0,0 – 0,1	0,3 – 0,5	0,02 – 0,5	0,2	0,2
Fibrin- ogen	g/l	61	1,0 – 2,6	0,9 – 1,1	2,2 – 2,8	0,88 – 2,77	1,5	1,5

Ergebnisse

Tabelle 7: Referenzintervalle, Konfidenzintervalle, Spannbreite, Median und Mittelwerte der untersuchten Parameter.

Abkürzungen: n = Probandenanzahl, RI = Referenzintervall, CI = Konfidenzintervall, TT = Thrombinzeit, PT = Prothrombinzeit, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, APC = aktiviertes Protein C, PC = Protein C, PS = Protein S, AT = Antithrombin, FVIII = Faktor VIII, FXII = Faktor XII, aFXa = anti-Faktor Xa

Der Quotient nach Harris und Boyd (209) – modifiziert von Linnet (210) - aus der Weite des Konfidenz- (WCI) und Referenzintervalls (WRI) zur Überprüfung, ob eine ausreichende Anzahl an Proben zur Referenzintervallermittlung herangezogen wurde, ist ebenso wie die für seine Berechnung notwendigen Spannbreiten der Referenz- und Konfidenzintervalle in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (Tabelle 8).

	WRI	WCI unten	WCI/WRI unten	WCI oben	WCI/WRI oben
TT	5,5	0,4	0,07	1,8	0,33
PT	2,4	0,2	0,08	0,9	0,38
aPTT	3,3	0,6	0,18	0,7	0,21
APC-R Ratio	1,7	0,4	0,24	0,4	0,24
Protein C	282	16	0,06	85	0,3
Protein S	300	41	0,14	83	0,28
Antithrombin	50	6	0,12	7	0,14
FVIII	68	10	0,15	14	0,21
FXII	69	6	0,09	15	0,22
aFXa	0,1	0	0	0	0
D-Dimere	0,4	0,1	0,25	0,2	0,5
Fibrinogen	1,6	0,2	0,13	0,6	0,38

Tabelle 8: Spannbreite der Referenz- und Konfidenzintervalle sowie ihre Quotienten zur Überprüfung der Sicherheit der unteren und oberen Grenzen der Referenzintervalle.

Fett gedruckt sind Quotienten, die den Wert 0,2 überschreiten (209).

Abkürzungen: WRI = Weite des Referenzintervalls, WCI = Weite des Konfidenzintervalls, TT = Thrombinzeit, PT = Prothrombinzeit, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, APC-R = Resistenz gegen aktiviertes Protein C, FXII = Faktor XII, aFXa = anti Faktor Xa

Eine graphische Verteilung der einzelnen Messwerte aller untersuchten Parameter mit Box-und-Whisker Plot (Abbildung 6) sowie ihre Histogramme (Abbildung 7) sind nachfolgend dargestellt.

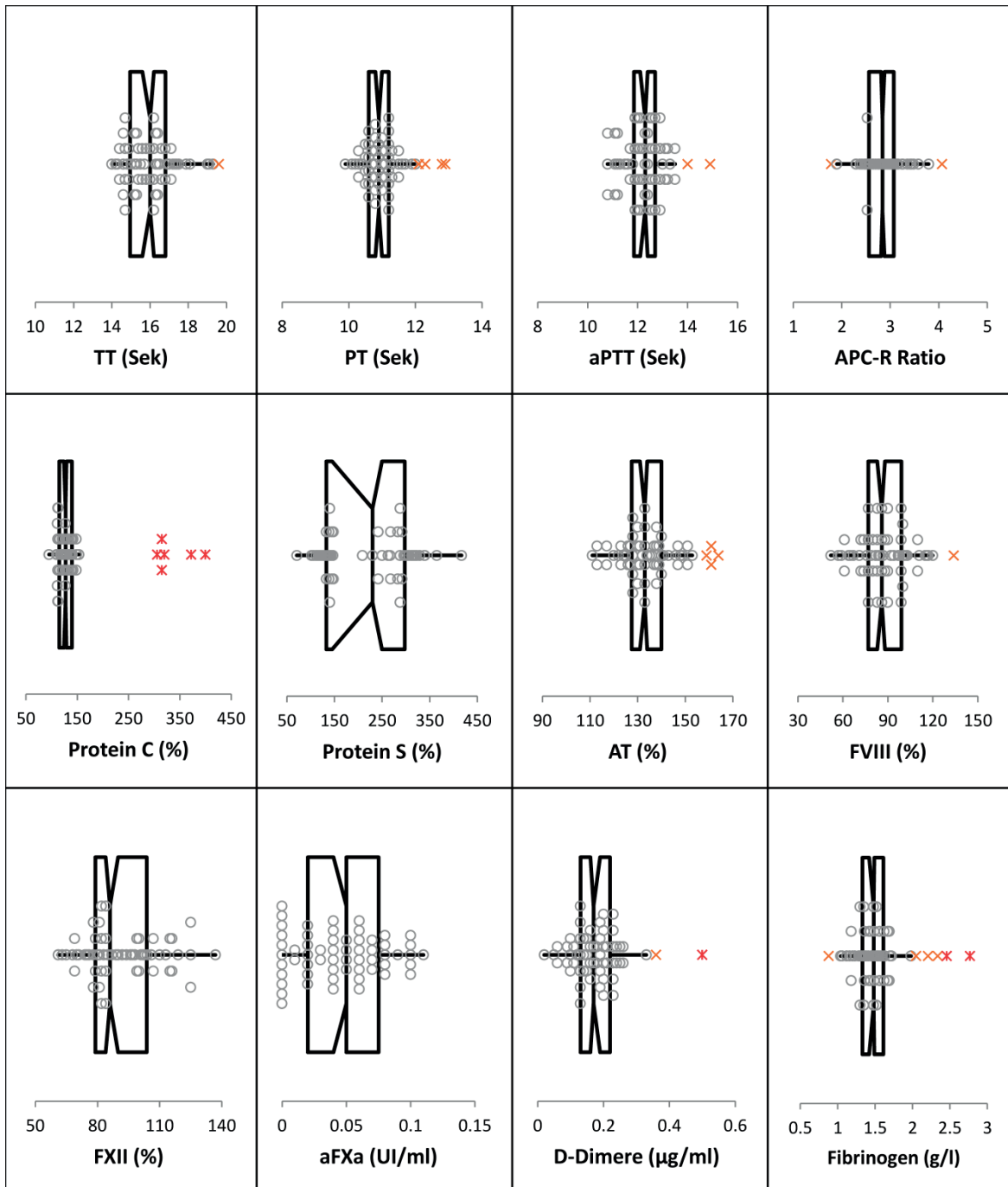


Abbildung 6: Verteilung der Messergebnisse der Referenzintervallermittlung.

Jeder Kreis und jedes Kreuz entspricht einem Messwert. Die Kreuze (orange und rot) wurden dabei in den statistischen Verfahren (nach Tukey) als Ausreißer vermutet oder als solche identifiziert (rotes Kreuz mit senkrechtem Strich). Die schwarz eingezeichneten

Ergebnisse

Boxen kennzeichnen die mittleren 50 % der Werte, die horizontalen Linien zeigen die Verteilungsbreite (range) an.

Abkürzungen: TT = Thrombinzeit, PT = Prothrombinzeit, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, APC-R = Resistenz gegen aktiviertes Protein C, AT = Antithrombin, F = Faktor, aFXa = anti-Faktor Xa

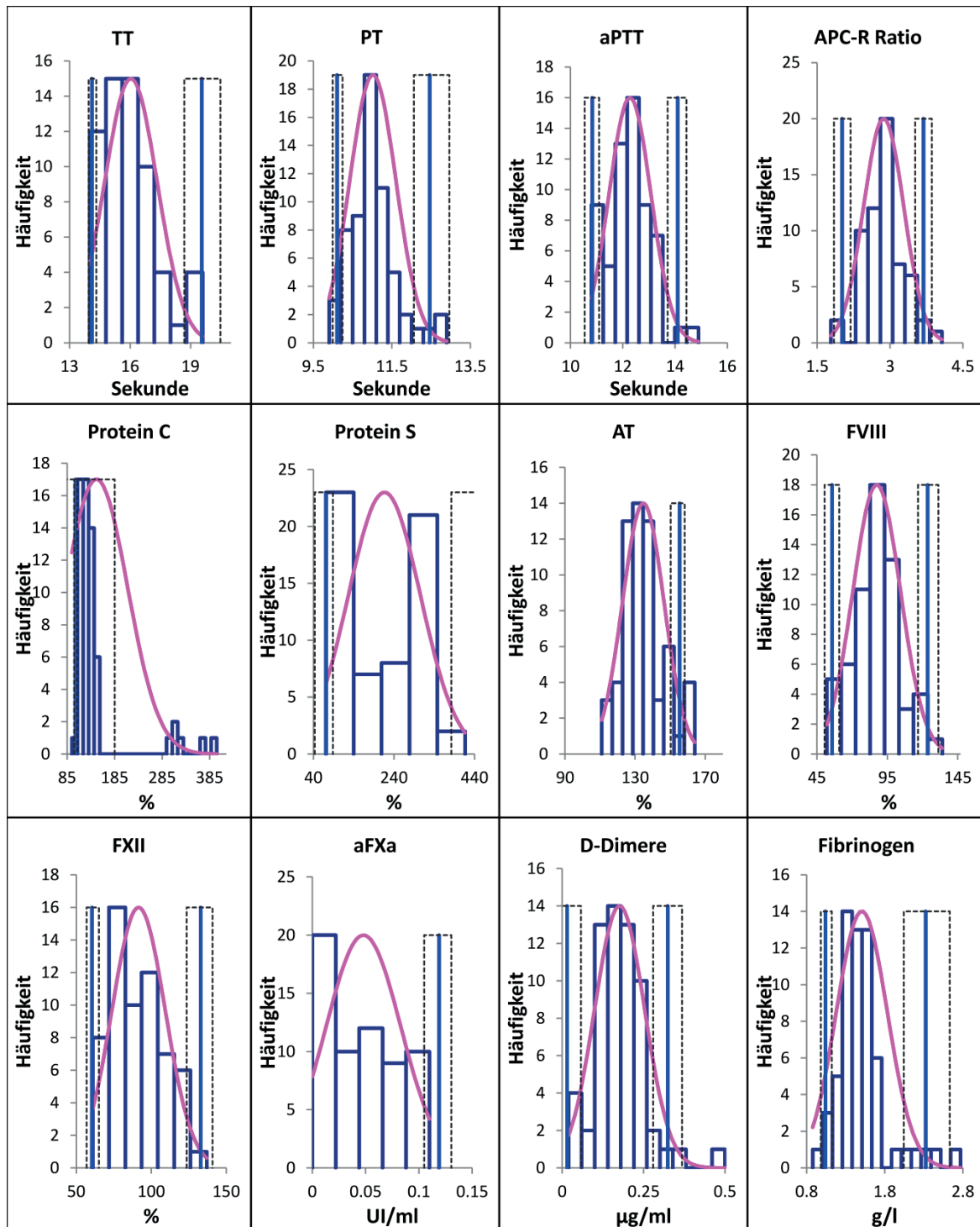


Abbildung 7: Histogramme der beobachteten Verteilung (dunkelblaue Linie) untransformierter Daten der untersuchten Parameter für die Referenzintervallermittlung. Die blaue solide Linie zeigt das Referenzintervall. Die schwarz gestrichelte Linie um die blaue Linie zeigt das 90 %ige Konfidenzintervall. Die pinke Linie entspricht der Gaußschen Verteilungskurve.

Auffällig hierbei sind die Parameter Protein C und Protein S, welche die Katzen in zwei Populationen zu trennen scheinen: Eine jeweils größere Population mit Werten um 120 % (Protein C) bzw. 140 % (Protein S) und eine kleinere Population mit Werten um 350 % (Protein C) bzw. 300 % (Protein S). Dabei zeigten alle Katzen, die hohe Protein C-Werte aufwiesen, ebenfalls eine hohe Protein S-Aktivität. Da es sich bei der Population im Bereich der höheren Konzentration von Protein C nur um wenige Katzen handelt, wurden diese in der Statistik durchweg als Ausreißer angesprochen. Um dies zu überprüfen und die Messungen zu bestätigen, wurden die Proben einzelner Katzen beider Populationen nachgemessen, sofern noch Citratplasma vorhanden war ($n = 19$). Die Ergebnisse dieser Nachmessung sind in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 9) dargestellt.

Parameter	Alter Wert (Messtag)	Neuer Wert (Messtag)	Prozentuale Abweichung des neuen Wertes vom alten Wert
Protein C (%)	315 (3)	319 (6)	1,3
	148 (4)	326 (6)	120,3
	315 (5)	149, 158* (6)	51,3
	400 (3)	382 (6)	4,5
	95 (1)	88 (6)	8,0
Protein S (%)	71 (1)	66 (6)	7,6
	301 (5)	336 (6)	11,6
	417 (3)	427 (6)	2,4
	329 (4)	348 (6)	5,8
	323 (4)	341 (6)	5,6
	106 (2)	88 (6)	17,0
	102 (2)	110 (6)	7,8
	306 (2)	357 (6)	16,7
	365 (3)	404 (6)	10,7
	339 (2)	355 (6)	4,7
	112 (1)	112 (6)	0,0
	322 (3)	343 (6)	6,5
	307 (3)	336 (6)	9,5
	312 (5)	334 (6)	7,1

Tabelle 9: Nachmessungen der Werte von Protein C und Protein S einzelner Katzen.

Die fett gedruckten Werte weisen auf deutliche Diskrepanzen (> 20%) zwischen den Messungen hin.

** = Diese Nachmessung wurde aufgrund der deutlichen Diskrepanzen wiederholt gemessen.*

Bei 2 Katzen (2/5) wurden bei der Nachmessung von Protein C hochgradige Abweichungen zwischen den Messungen festgestellt (neue Messung 120 % höher oder 51 % tiefer als alte Messung), wobei die nachgemessenen Werte jeweils im Bereich der

Ergebnisse

anderen Population zu liegen kommen. Bei einer dieser Katzen (1/2) war genügend Plasma vorhanden, so dass eine wiederholte Messung der Nachmessung durchgeführt wurde, welche den ersten nachgemessenen Wert bestätigte. Bei allen anderen Katzen (17/19) wurde eine Abweichung zwischen den Messergebnissen von unter 20 % festgestellt, was somit das Resultat der Erstmessung bestätigte.

5.6 Geschlechtervergleich

Es konnte, wie in der nachfolgenden Graphik (Abbildung 8) dargestellt, ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Ergebnisse der Thrombinzeit, Prothrombinzeit und Antithrombin nachgewiesen werden.

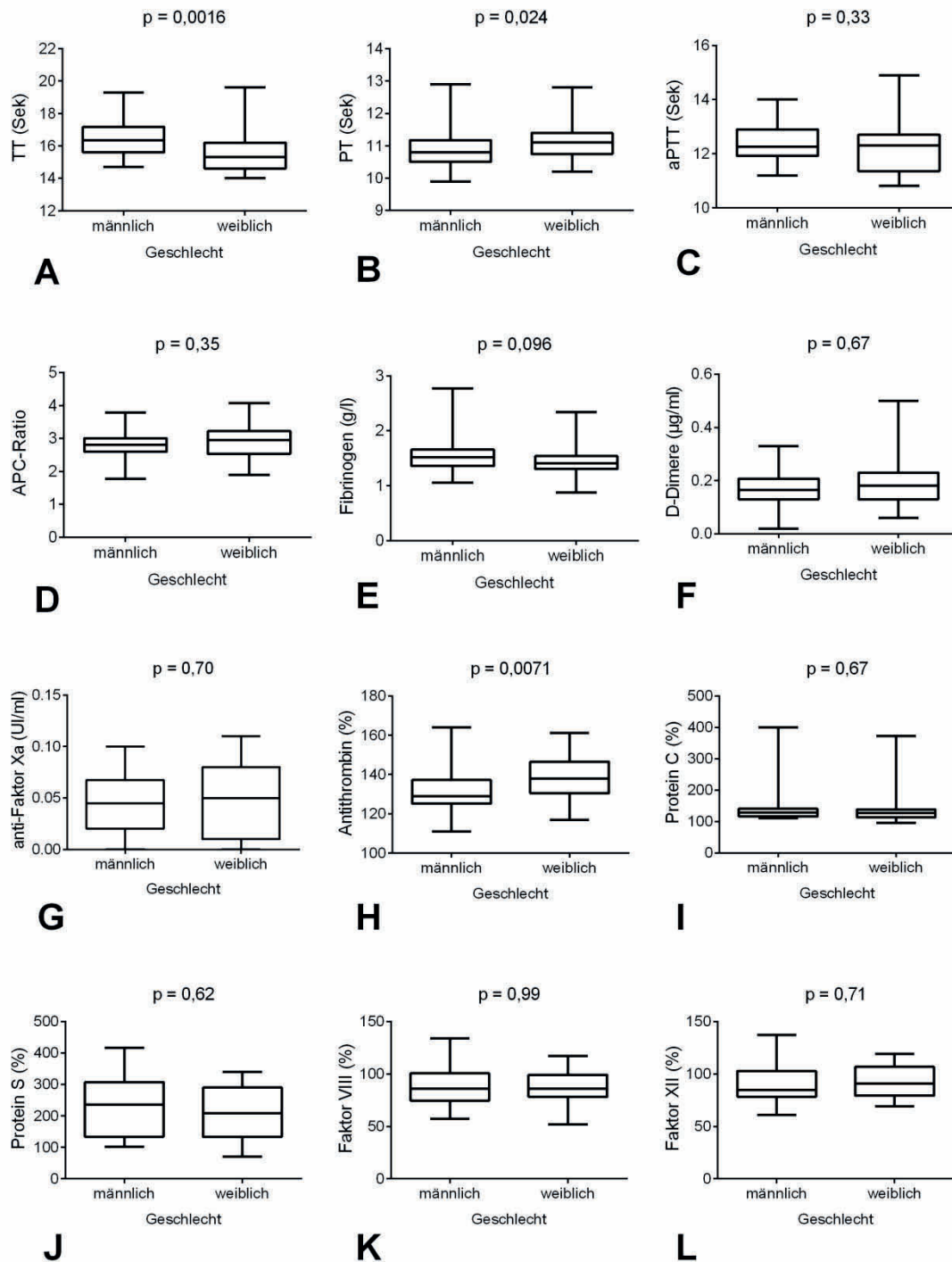


Abbildung 8: Einfluss des Geschlechts auf die Referenzintervalle dargestellt als Box- und Whisker Diagramm.

Jeweils links sind die Werte der männlichen Tiere und rechts die Werte der weiblichen Tiere aufgeführt. Die Box entspricht dabei den mittleren 50 % der Werte und der Strich in der Mitte der Box dem Median. Die Antenne („Whisker“) zeigen die Verteilungsbreite auf.

Ergebnisse

Dabei war bei weiblichen Tieren die Thrombinzeit signifikant kürzer ($p = 0,0016$) und die Prothrombinzeit signifikant länger ($p = 0,024$) als bei männlichen Tieren. Katzen zeigten eine signifikant höhere Antithrombin-Aktivität im Vergleich zu Katern ($p = 0,0071$). Hinsichtlich einer klinischen Signifikanz wurden die Differenzen der Mittelwerte zwischen männlichen und weiblichen Tieren ermittelt (235). Diese ergaben 0,84 Sekunden für die Thrombinzeit (Kater: 16,44 Sek, Katzen: 15,60 Sek), 0,31 Sekunden für die Prothrombinzeit (Kater: 10,87 Sek, Katzen: 11,18 Sek) und einen Unterschied der Mittelwerte von 6,7 % für die Antithrombin-Aktivität (Kater: 131,5 %, Katzen: 138,2 %). Da diese Unterschiede nicht 25 % des Referenzintervalls überschritten, konnten sie als klinisch nicht signifikant eingeordnet werden (235). Geschlechts-spezifische Referenzintervalle zu ermitteln, war somit nicht notwendig.

6. Diskussion

6.1 Voruntersuchungen

Tierartliche Unterschiede in der Konzentration oder Aktivität einzelner Faktoren der Gerinnung sind bereits für verschiedene Spezies im Vergleich zum Menschen analysiert worden (236). Die bei Katzen verglichen mit dem Menschen erhöhte Aktivität der Faktoren XII und VIII wurde von Lutze und Kutschmann beschrieben (237). Auch bei Hunden ist eine im Vergleich zum Menschen erhöhte Aktivität von Faktor VIII ebenso wie eine verminderte Aktivität der endogenen Antikoagulantia Protein C und Protein S – wie hier auch für Katzen nachgewiesen - beschrieben worden (230). Daher musste hier eine Anpassung dieser Tests unter Verwendung Spezies-spezifischer Kalibrationen aus Poolplasma erfolgen, wobei für das Poolplasma eine Aktivität von jeweils 100 % im normalen Level (unverdünnte Probe) festgelegt wurde. Alle weiteren Messungen erfolgten dann mit der festgelegten Kalibration im Vergleich zum Poolplasma, wie beispielhaft für FXII in Abbildung 9 dargestellt. Die Verdünnungsstufen für die jeweiligen Kalibrationen wurden dabei so gewählt, dass eine möglichst lineare Funktion mit einem Korrelationskoeffizienten von über 0,97 erreicht wurde.

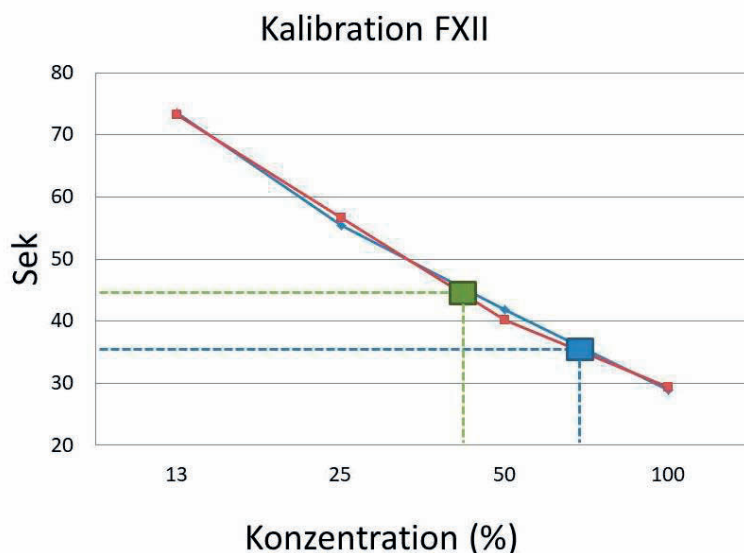


Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung der durchgeführten Kalibrationen (hier für FXII) in Doppelmessungen (rote und blaue durchgezogene Linie). Die kleinen blauen und roten Punkte auf den durchgezogenen Linien stellen die Ergebnisse der seriellen Verdünnungsstufen (100%, 50%, 25% und 12,5%) dar, die durch eine entsprechende

Verdünnung des Poolplasmas gewonnen wurden. Das große grüne und blaue Viereck symbolisiert beispielhaft das Ergebnis zweier einzelner Katzen, gemessen mit der angezeigten Kalibration und in Vergleich zu dem Poolplasma stehend.

Wie in Tabelle 2 zu sehen ist, stellte sich die Kalibration von Faktor VIII als die schwierigste heraus.

Diese notwendigen Anpassungen in der Messmethodik stellten allerdings einen gewissen Schwachpunkt in der Analytik dar, da kleine Unterschiede in der Konzentration eines Analyten durch eine weitere Verdünnung des Plasmas größere Auswirkungen auf die Messergebnisse haben können, wie schematisch in Abbildung 10 dargestellt.

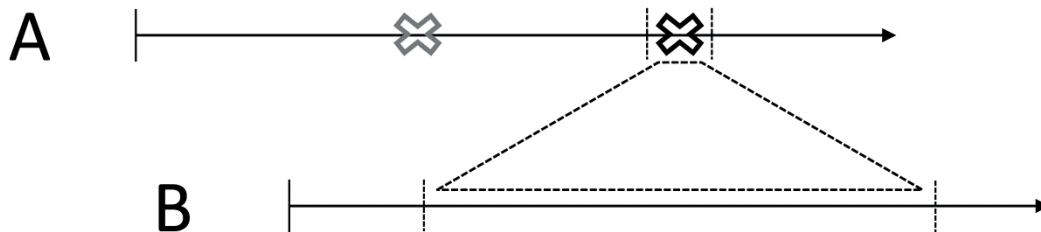


Abbildung 10: Vereinfachtes Schaubild zur Darstellung möglicher Auswirkungen der Verdünnungen auf die Messergebnisse.

Der obere Pfeil (A) beschreibt den Standardtest, der untere (B) den modifizierten Test. Das graue Kreuz kennzeichnet den Bereich der physiologischen humanmedizinischen Werte, das schwarze den der Katzen. Durch die Verdünnung wird der kleine Bereich der Werte gestreckt, was durch die gestrichelten Linien angezeigt wird.

Die Entscheidung, Antithrombin trotz der bei Katzen hier im Vergleich zum Menschen nachgewiesenen geringgradig höheren Aktivität (siehe Tabelle 1) unter Verwendung der humanen Standardkurve zu messen, wurde ebenfalls in der Studie von Brazzell et al. (213) gefasst. Obwohl die Autoren der genannten Studie (213) zwar eine Katzen-spezifische Standardkurve für die Messung der Antithrombin-Aktivität am STA Compact® erstellten, haben sie diese aufgrund der großen Ähnlichkeit mit der humanen Standardkurve dennoch nicht verwendet.

6.2 Replikationsstudien (Wiederholbarkeit)

Hinsichtlich der in dieser Dissertationsarbeit ermittelten intra-assay Variationskoeffizienten und somit der Wiederholbarkeit über einen kurzen Zeitraum ist die Anzahl der durchgeführten Wiederholungen ($n = 10$) als gewisse Limitation zu sehen, da in den Qualitätskontroll-Richtlinien der ASVCP eine 20-fach wiederholte Messung zur Ermittlung der Variationskoeffizienten empfohlen wird (220). Aufgrund der damit verbundenen hohen Kosten wurde hier jedoch auf eine 20-fache Messung verzichtet. Weiterhin ist – vermutlich aus ähnlichen Gründen – auch in anderen veterinärmedizinischen Studien, die eine Evaluation von Gerinnungsparametern durchführten, eine 10-fache Messung durchaus üblich (z. B. Brazzell et al. (213): 5-fache Wiederholung; Eralp (227): 15-fache Wiederholung; Reynolds et al. (238): 10-fache Wiederholung).

Die hier ermittelten intra-assay Variationskoeffizienten erfüllten alle – wie in Tabelle 3 gezeigt und von der ASVCP beschrieben (220) – das geforderte Akzeptabilitätskriterium ($VC (\%) < TE_a (\%)$). Insgesamt erfüllten somit alle im Rahmen dieser intra-assay Wiederholbarkeit gemessenen Parameter die veterinärmedizinischen Anforderungen (220), auch wenn die zum Vergleich angeführten Daten des TE_a der Humanmedizin (224) entstammen und somit nur bedingt für einen Vergleich geeignet sind. Wie bei einem Vergleich der TE_{as} für Werte der klinischen Chemie ersichtlich wird, sind die humanmedizinischen TE_{as} tendenziell niedriger (und somit „strenger“) als die Veterinärmedizinischen (222, 224). Ein Vergleich von TE_{as} hämostatischer Tests aus Human- (224) und Veterinärmedizin (239), wie in Tabelle 10 aufgeführt, zeigt hingegen, dass die TE_{as} zwischen Mensch und Hund geringgradig unterschiedlich sein können, wobei auch die veterinärmedizinischen TE_{as} niedriger (und somit „strenger“) sein können als die humanmedizinischen. Als Akzeptabilitätskriterium für die in dieser Dissertationsarbeit ermittelten Daten der Wiederholbarkeit und des Einflusses von Interferenzen wären daher Spezies-spezifische TE_{as} optimal, was aufgrund der derzeitigen Studienlage jedoch nicht möglich ist.

Daher wurden weiterführend die hier ermittelten intra-assay und inter-assay Wiederholbarkeiten (in Form des VC) mit den Angaben des Herstellers und beim Hund erhobenen Daten (227) verglichen, wie nachfolgend tabellarisch (Tabelle 10) aufgeführt.

Diskussion

Die Ergebnisse von Eralp (227) sind dabei im Gegensatz zu anderen veterinärmedizinischen Studien insbesondere für einen Vergleich mit den hier bei Katzen ermittelten Daten geeignet, da die Messungen unter sehr ähnlichen Bedingungen (u. a. gleicher Analysator) erfolgten.

Studie & Maß- einheit Para- meter	Eigene Studie – intra- assay VC (%)	Eigene Studie – inter- assay VC (%)	Hersteller- angabe des Testkits – intra-assay VC (%)	Hersteller- angabe des Testkits – inter-assay VC (%)	Eralp (227) – intra- assay VC (%) [‡]	Wiinberg et al. (239) – TE _a (%), Hund	Daten- bank (224)* TE _a (%), Mensch
TT	1	3	2,8 ‡	1,6 †	1,6	4,3	k.A.
PT	2	6	0,7 ‡	1,5 †	1,2	2,4	5,3
aPTT	1	5	0,6 ‡	3,5 †	1,0	34	4,5
AT	3	6	2,6 ‡	4,8†	4,7	1,5	8,3
PC	1	8	4,6 ‡	4,8 †	2,4	k. A.	18,7
PS	2	21	4,4 ‡	5,6 †	1,4	k. A.	20,7
APC-R Ratio	1	24	k. A.	k. A.	1,5	k. A.	k. A.
FVIII	3	13	6,4 †	8,4 †	3,9	k. A.	8,9
FXII	6	7	2,9 ‡	3,5 †	k. A.	k. A.	k. A.
Fibrinogen	5	7	2,8 ‡	1,2 †	5,6	18,4	13,6
D-Dimere	18	8	6,3 ††	3,6 ††	45,9	49,9	28,0
aFXa	200	5	**		12,8	k. A.	k. A.

Tabelle 10: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten intra-assay (zehnfache Messung) und inter-assay (6 Messungen) Variationskoeffizienten mit den Ergebnissen einer Studie bei Hunden und den Herstellerangaben.

Als Akzeptabilitätskriterium dient der in einer humanmedizinischen Datenbank (Westgard QC (224)) veröffentlichte TE_a. Messergebnisse, welche diesen humanmedizinischen TE_a überschreiten sind fett gedruckt. Dem weiteren Vergleich dienen bei Hunden ermittelte TE_{aS} (239).

* Zugang über <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>

** Da nur Heparin-haltige Proben verwendet wurden ist hier kein Vergleich möglich.

† 10-fache Wiederholung, ‡ 15-fache Wiederholung, †† 20-fache Wiederholung, ‡ 21-fache Wiederholung

Abkürzungen: VC = Variationskoeffizient, TE_a = absoluter erlaubter Fehler, TT = Thrombinzeit, PT = Prothrombinzeit, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, AT = Antithrombin, PC = Protein C, PS = Protein S, APC-R = Resistenz gegen aktiviertes Protein C, F = Faktor, aFXa = anti-Faktor Xa, k. A. = keine Angabe

Wie in Tabelle 10 aufgeführt, wurden beim Hund (227) ähnliche intra-assay Variationskoeffizienten für Messungen am STA Compact® gefunden wie in dieser Arbeit bei Katzen.

Wiinberg et al. (239) zeigten ebenfalls beim Hund gemessene Variationskoeffizienten als objektiven analytischen Standard der Impräzision von < 2 % für die Parameter PT, TT und AT, während die Messung der aPTT einen höheren VC aufwies (9,7 %). Hinsichtlich der intra-assay Präzision der Fibrinogenmessung wurden für den Hund sowohl in der Arbeit von Eralp (227) als auch von Wiinberg et al. (239) beim Hund VCs von ca. 6 % (5,6 % bzw. 6,5 %) ermittelt, die den hier festgestellten Resultaten bei Katzen (5 %) entsprechen.

Im Vergleich der bei Katzen ermittelten intra-assay VCs zur Herstellerangabe liegen fünf Parameter (TT, AT, PC, PS, FVIII) im Bereich der vom Hersteller angegebenen VCs und vier Parameter (PT, aPTT, FXII, D-Dimere) oberhalb den vom Hersteller angegebenen VCs. Dieser Vergleich ist allerdings nur eingeschränkt hinsichtlich der Akzeptabilität der Tests zu verwenden, da sich die Herstellerangaben auf humanes Plasma beziehen.

Ein Vergleich der hier ermittelten VCs mit anderen Studien bei Katzen ist aufgrund der nur sehr selten beschriebenen analytischen Variation bei hämostatischen Tests der Katze kaum möglich. Brazzell et al. (213) beschrieben einen intra-assay VC von 2,5 % für die Antithrombin-Messung, welche anhand einer 5-fachen Wiederholung ermittelt wurde. Dieser Wert gleicht dem intra-assay VC dieser Dissertationsarbeit.

Andere humanmedizinische Studien ergaben für Antithrombin Variationskoeffizienten zwischen 1 und 2 % (1,1 % (240), 1,8 % (241)).

Für die Thrombinzeit ergab eine humanmedizinische Studie einen intra-assay VC von 1 % (242), was dem Wert dieser Arbeit bei Katzen entspricht. Chen et al. (242) beschrieben weiterhin einen Variationskoeffizienten von 3,6 % für die Messung von Faktor VIII beim Menschen, was dem Wert bei Katzen gleicht. Für die Messung von Faktor XII wurde von Chen et al. (242) ein analytischer Variationskoeffizienten von 1,9 % festgestellt, was geringfügig niedriger ist als der hier bei Katzen gemessene Wert.

Der intra-assay Variationskoeffizient der D-Dimer Messung (18 %) ähnelt bisher publizierten Daten bei Hunden ((19,8 %)(239) bzw. (45,9 %)(227)). Auch in einer Studie

bei Menschen wurden vergleichbare Variationskoeffizienten der D-Dimer Messung gefunden (zwischen 31,8 % (nicht schwanger) und 15,1 % (schwanger)) (243).

Dass der Variationskoeffizient der D-Dimer-Messung ebenso wie der Variationskoeffizient der anti-Faktor Xa-Bestimmung recht hoch ist, kann durch die niedrige Konzentration der Analyten bedingt sein (244), welche allerdings bei gesunden Tieren zu erwarten ist. Um eine bessere Aussagekraft über die Wiederholbarkeit bzw. Präzision dieser Tests zu erzielen, sollten in weiteren Studien Mehrfachmessungen an Plasma von Katzen mit erhöhten D-Dimer-Konzentrationen bzw. Plasma von Katzen mit Heparintherapie (für die Messung des aFXa) erfolgen. Die Tatsache, dass überhaupt wenn auch sehr niedrige Konzentrationen an aFXa gemessen werden konnten, kann durch ein „Grundrauschen“ erklärt werden, das durch unspezifische Farbreaktionen bei diesem photometrischen Test bedingt sein kann.

Die Verwendung von Kontrollen für die Evaluation des inter-assay Variationskoeffizienten einer Langzeitreplikation sind aus verschiedenen Gründen nur eingeschränkt nutzbar: Erstens wurden in der Dauer dieser Dissertationsarbeit verschiedene Chargen von Reagenzien verwendet, welche nicht nur einen Einfluss auf die Ergebnisse hätten haben können, sondern ebenfalls dazu führten, dass die Kalibrationen von Faktor XII, Faktor VIII, Protein C und S bei unterschiedlichen Chargen an Reagenzien (nach Tag 3 und 5) erneuert werden mussten. Zweitens ist die von der ASVCP (220) empfohlene Anzahl an Wiederholungen ($n = 20$) unterschritten. Drittens handelt es sich bei den Qualitätskontrollen für die mittels humaner Standardeinstellung gemessenen Parameter um ein für die Humanmedizin genormtes Probenmaterial und nicht um Katzen-spezifische Reagenzien.

Trotz dieser Problematik und der Verwendung unterschiedlicher Reagenzien entsprachen die inter-assay Variationskoeffizienten für die Parameter AT, PC, Fibrinogen und D-Dimere den Anforderungen der Qualitätskontroll-Richtlinien der ASVCP wobei die Angaben für den absolut zulässigen (Gesamt-) Fehler wiederum aus der Humanmedizin stammen mangels Daten aus der Veterinärmedizin.

Die inter-assay VCs der Parameter aPTT, PT und PS lagen nur minimal oberhalb des jeweiligen humanmedizinischen TE_a und erfüllten somit in diesem Vergleich die Anforderungen an die Akzeptabilität des Tests ($VC (\%) < TE_a (\%)$) knapp nicht (220). Wenn

man die von Wiinberg et al. (239) bei Hunden erhobenen TE_{aS} (siehe Tabelle 10) als Vergleich bzw. Akzeptabilitätskriterium verwenden würde, würde die aPTT als akzeptabel eingestuft, wohingegen die PT nach wie vor den Grenzwert bzw. TE_a überschreiten würde. Dieser Vergleich verdeutlicht die nur eingeschränkte Nutzbarkeit Spezies-übergreifender Grenzwerte. Da in dieser Arbeit insgesamt humanmedizinische TE_{aS} anstatt Katzen-spezifischer TE_{aS} als Akzeptabilitätskriterium verwendet wurden, sollten diese eher als Richtwert anstatt als Grenzwert gesehen werden. Insgesamt kann daher aufgrund der nur geringen Abweichungen der inter-assay VCs der aPTT, PT und von PS von den TE_{aS} von einer akzeptablen Messbarkeit dieser Tests ausgegangen werden.

Wenn auch nur knapp oberhalb des humanmedizinischen TE_a und daher als akzeptabel eingestuft, ist der inter-assay VC von Protein S mit 21 % bemerkenswert hoch. Dies kann unter anderem durch die analytische Variation bei Verwendung verschiedener Kalibrationen bedingt sein (nach Tag 3 und nach Tag 5; siehe Abbildung 5). Andererseits zeigten die gemessenen Kontrollwerte für Protein S innerhalb einer Kalibration (Tag 1-3) ebenso große Abweichungen wie zwischen den Kalibrationen (Tag 5-6), so dass der erhöhte inter-assay VC nicht alleine den unterschiedlichen Kalibrationen zugeschrieben werden kann. Weiterhin kann die Tatsache, dass die Messung von PS für die Katze angepasst bzw. insgesamt anhand der Erstellung einer seriellen Verdünnungskurve von Poolplasma neu kalibriert werden musste, mögliche Schwankungen in den Messergebnissen erklären, wie in Abbildung 9 dargestellt. Eine weitere Anpassung dieser Kalibrationen durch andere Verdünnungsstufen (weniger oder höher verdünnt, je nach Konzentration des Analyten) wäre somit zu überdenken, wobei - wie insbesondere für Faktor VIII nachgewiesen – höhere oder niedrigere Verdünnungen getestet und ausgeschlossen wurden aufgrund schlechterer Linearität (bzw. Korrelationskoeffizienten, die weiter von 1 bzw. -1 entfernt waren, siehe Tabelle 2).

Der inter-assay VC von FVIII überschreitet ebenfalls den humanmedizinischen TE_a , was die Akzeptabilität dieser Messung in Frage stellen könnte. Allerdings ist auch dieser Vergleich wieder durch fehlende veterinärmedizinische Daten für den TE_a nur eingeschränkt möglich und der humanmedizinische TE_a eher als Richtwert zu betrachten.

Zur sicheren Beurteilbarkeit, ob die durchgeführten Tests das veterinärmedizinische Akzeptabilitätskriterium ($VC (\%) < TE_a (\%)$) erfüllen, wären zukünftig Daten für veterinärmedizinische und optimal Katzen-spezifische TE_{aS} von Nöten. Diese Daten

könnten unter anderem durch klinische Entscheidungsgrenzen oder anhand der biologischen Variation erhoben werden (222, 245). Weitere Daten hinsichtlich der biologischen Variation wurden in dieser Dissertationsarbeit aufgrund der hohen Kosten hämostatischer Tests und mangels ausreichenden Patientenplasmas nicht erhoben.

6.3 Interferenzen

Die Interferenzanalyse wurde zur Abschätzung des systematischen Fehlers (systemic error, SE) durchgeführt, wobei die Einflussgrößen einer Hämolyse und Lipämie untersucht wurden (220). Als Kriterium für eine akzeptable Leistungsfähigkeit galt wiederum $SE < TE_a$ (220).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Lipämie als auch eine Hämolyse einen Einfluss auf die Messung der D-Dimere und des anti-Faktor Xa haben kann, wobei beide Parameter in dem stark lipämischen Plasma nicht messbar waren. Die größere Abweichung von der Kontrolle bei höherer Konzentration an Störsubstanz war dabei zu erwarten (220).

Ein Vergleich des ermittelten SE in Form des Bias mit publizierten Werten (Bias und TE_a) einer humanmedizinischen Datenbank (Quelle: Westgard (224)) ist in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 11) aufgeführt.

Parameter	Eigene Studie Lipämie		Eigene Studie Hämolyse		Westgard Datenbank (224)* Ungenauigkeit (%)	Westgard Datenbank (224)* TE _a (%)
	Ansatz A Bias (%)	Ansatz B Bias (%)	Ansatz a Bias (%)	Ansatz b Bias (%)		
TT	1,2	1,7	3,2	1,8	k. A.	k. A.
PT	0,5	1,4	0,5	0,9	2,0	5,3
aPTT	0,0	0,8	0,8	0,0	2,3	4,5
AT	3,0	3,7	8,8	3,9	4,0	8,3
PC	0,0	0,4	2,9	2,5	13,9	18,7
PS	9,2	8,4	0,3	1,7	15,9	20,7
APC-R Ratio	1,5	1,5	0,4	5,7	k. A.	k. A.
FVIII	2,0	0,0	2,7	2,7	4,9	8,9
FXII	0,6	2,3	1,7	6,2	k. A.	k. A.
Fibrinogen	0,0	2,1	6,1	2,7	4,8	13,6
D-Dimere	n. m.	206,1	190,0	60,0	8,8	28,0
aFXa	n. m.	91,7	337,5	87,5	k. A.	k. A.

Tabelle 11: Vergleich des in der Interferenzstudie ermittelten systemischen Fehlers mit in einer Datenbank (Westgard QC) veröffentlichten Werten.

Fett gedruckt sind Werte, die den absolut zulässigen Fehler überschreiten.

** Zugang über <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>*

Abkürzungen: TT = Thrombinzeit, PT = Prothrombinzeit, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, AT = Antithrombin, PC = Protein C, PS = Protein S, APC-R = Resistenz gegen aktiviertes Protein C, F = Faktor, aFXa = anti-Faktor Xa, n. m. = Berechnung nicht möglich, k. A. = keine Angabe

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, überschreitet der SE (in Form des Bias) der D-Dimere (und anti-Faktor Xa) in den hämolytischen und lipämischen Ansätzen sowie der Bias von Antithrombin in dem stark hämolytischen Ansatz den jeweiligen der Humanmedizin entnommenen TE_a, so dass das veterinärmedizinische Akzeptabilitätskriterium (Bias (%) < TE_a (%)) unter Verwendung der humanmedizinischen TE_as hier nicht erfüllt wurde. Da kaum veterinärmedizinische Daten – und insbesondere keine Katzen-spezifischen Daten –

für den TE_a hämostatischer Tests vorhanden sind, musste hier auf humanmedizinische Angaben zurückgegriffen werden. Ein diese Messungen (D-Dimere, anti-Faktor Xa und zum Teil Antithrombin) beeinflussender Effekt durch eine Lipämie oder Hämolyse wurde somit nachgewiesen.

Laut Leistungsdaten des Herstellers sollte Antithrombin stabil sein bis zu einer Hämoglobin-Konzentration von 7 g/l. Dies konnte in diesem Interferenzversuch nicht bestätigt werden, da die hohe Hämoglobin-Konzentration (5 g/l) zu einem systemischen Fehler führte, der das Akzeptabilitätskriterium ($\text{Bias}_{\text{gemessen}} (\%) > TE_a (\text{hier: human}) (\%)$) überschritt.

Die Messung von anti-Faktor Xa sollte laut Herstellerangaben bis zu einer Hämoglobin-Konzentration von 1,5 g/l und einer Triglycerid-Konzentration von 6,9 g/l stabil sein. Dies konnte ebenfalls nicht bestätigt werden, da sowohl bei den in diesem Rahmen liegenden Testansätzen (B und b) als auch bei den oberhalb der vom Hersteller angegebenen Toleranzgrenze liegenden Testansätze (A und a) ein deutlicher systemischer Fehler nachgewiesen wurde.

Die Herstellerangabe bezüglich einer Hämoglobin-Interferenz für die Messung der D-Dimere liegt bei 2 g/l, was in dieser Arbeit ebenfalls nicht bestätigt werden kann, da bereits die niedrige Hämoglobin-Konzentration (b) zu einem systemischen Fehler führte, der das veterinärmedizinische Akzeptabilitätskriterium ($\text{Bias}_{\text{gemessen}} (\%) > TE_a (\text{hier: human}) (\%)$) überschritt.

Bei einem strengeren Vergleich der ermittelten systemischen Fehler mit den humanmedizinischen Vorgaben für die Ungenauigkeit dieser Tests, überschritt ebenfalls Fibrinogen in dem stark hämolytischen Ansatz (a) den TE_a . Die falsch niedrige Messung von Fibrinogen (246, 247, 248) und Antithrombin (246, 249) sowie die falsch hohe Messung der D-Dimere (246, 247, 248) sind bereits in human- sowie tiermedizinischen Studien beschrieben. Die Prothrombinzeit und aktivierte partielle Thromboplastinzeit kann dabei sekundär zur Veränderung des Fibrinogen ebenfalls beeinflusst werden (246). Auch die Thrombinzeit kann sowohl durch eine Zugabe von Hämolysat als auch eine Zugabe von Triglyceriden verkürzt werden (250). Ein Einfluss auf die Parameter PT und aPTT, wie in der Humanmedizin beschrieben, konnte hier trotz Verwendung hoher Konzentrationen hier nicht nachgewiesen werden.

Der Einfluss einer Hämolyse auf die D-Dimer- und anti-Faktor Xa- Messung sowie der Einfluss einer Lipämie auf die D-Dimer Messung wurde bereits ebenfalls für Hunde beschrieben (227). Sowohl bei der Messung der D-Dimere als auch bei anti-Faktor Xa handelt es sich um photometrische Messungen, welche anfälliger für Interferenzen als mechanische Tests sind (246). Neben der optischen Interferenz durch Veränderung der Extinktion kann eine Hämolyse zur Ausschüttung intrazellulärer und thrombogener Substanzen führen und somit die Hämostase beeinflussen und die Messergebnisse verändern (246, 247). Auch die bei einer Lipämie beobachtete Interferenz kann optischer und biologischer Natur sein (248).

Ungewöhnlicherweise fiel bei der Messung von Protein S eine Abweichung innerhalb der Ergebnisse der lipämischen Probenansätze (Ansatz A: 254 % und 148 %; Ansatz B: 148 % und 189 %) und der Kontrolle (224 % und 144 %) auf. Diese Ergebnisse wurden durch eine wiederholte Messung bestätigt (Ansatz A: 231 % und 152 %; Ansatz B: 157 % und 219 %; Kontrolle: 233 % und 141 %). Ein Grund für diese Abweichung innerhalb der Ansätze könnte ein präanalytischer Fehler (z. B. nicht adäquate Vermengung des Plasmas, Luft-Bläschen in der Probe) sein. Da dies bei keinem anderen Parameter außer dem lipämischen Kontrollansatz von Antithrombin (162 % und 138 %) aufgetreten war, erscheint ein präanalytischer Fehler als Ursache jedoch unwahrscheinlich. Einen weiteren – und hier den wahrscheinlichsten – Grund stellt die wie in Abschnitt 6.1 diskutierte Verdünnung bei der Messung von Protein S dar, bei der bereits geringe Schwankungen innerhalb der Konzentration des Parameters eine breite Streuung der Ergebnisse bedingen kann. Andererseits hätte aufgrund der ähnlichen Messmethodik auch eine Divergenz innerhalb der Messung von Protein C der jeweiligen Ansätze auftreten können, was hier nicht der Fall war.

6.4 Stabilität der Proben

Die hier durchgeführte Überprüfung eines Lagerungs-bedingten Einflusses auf die Ergebnisse hämostatischer Tests ist als richtungsweisend zu werten, da aufgrund der nur geringen Plasmamengen und dem verzögerten Transport zum Ort der Messung keine Messung kurze Zeit nach dem Einfrieren möglich war. Mögliche Veränderungen in den Tests zwischen dem Zeitpunkt der Blutabnahme bzw. des initialen Einfrierens und der

Durchführung der Messungen (häufig nach ≥ 6 Monaten Lagerungszeit) wurden somit nicht untersucht.

Bei der hier durchgeführten Überprüfung der Stabilität zwischen einem Lagerungszeitpunkt von 7 Monaten verglichen mit einer Lagerungszeit von 11 Monaten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde eine über 10%ige Abweichung der Parameter Antithrombin, D-Dimere, anti-Faktor Xa und Protein C gefunden. Diese Abweichung in der Messung der D-Dimere und von anti-Faktor Xa kann dabei in Zusammenhang mit dem relativ hohen intra-assay Variationskoeffizienten dieser Tests als nicht relevant interpretiert werden.

Die Abweichungen innerhalb der Messungen von Antithrombin (Abweichung um 22 %) und Protein C (Abweichung von 16 %), welche jeweils durch eine gesteigerte Aktivität am zweiten Messzeitpunkt nach 4 Monaten Lagerung bedingt waren, lässt sich hingegen nicht alleinig durch einen Zufallsfehler erklären, da sie in den Replikationsstudien eine akzeptable Leistung zeigten. Eine lagerungsbedingte Veränderung dieser Parameter muss somit theoretisch in Betracht gezogen werden. Gegen eine lagerungsbedingte Veränderung von Protein C spricht, dass bei weiteren 5 Katzen (5/62) im Rahmen der Ausreißer-Überprüfung Messwerte von Protein C teils über ein Jahr nach Erstmessung erneut gemessen wurden und sich bei drei dieser Katzen (3/5) der zuerst gemessene Wert bestätigte (Unterschied $< 10\%$). Bei 2 dieser 5 Katzen zeigten sich Unterschiede zwischen den Messungen (Differenzen von 50 % bis 120 %), wobei die Nachmessungen teils erhöhte und teils verminderte Werte vergleichen mit der Erstmessung ergaben. Dies widerspricht ebenfalls der Theorie eines lagerungsbedingten Einflusses auf die Messergebnisse, welche durch einen Verbrauch/ Verlust oder Anstieg des Analyten bedingt sein kann und somit durchgängig verminderte oder durchgängig erhöhte Werte in den Nachmessungen erwarten lassen würde. Ein Einfluss der Lagerung auf die Messung von Protein C erscheint somit insgesamt unwahrscheinlich.

Hinsichtlich des Einflusses der Lagerung auf die Messung der Antithrombin-Aktivität konnten Bateman et al., im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit nachgewiesenen Anstieg der Antithrombin-Aktivität bei Katzen, eine Verminderung der Antithrombin-Aktivität bei Hunden nach einer Lagerung über 6 Monate bei -70°C nachweisen (251).

In der Humanmedizin hingegen konnte eine gute Stabilität für Protein C und Antithrombin bei mehrtägiger Lagerung bei $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ gezeigt werden (252) sowie beim Hund eine gute Stabilität beider Parameter bei einer Lagerung über mehrere Monate bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (230). Ein

signifikanter Einfluss einer Lagerung auf die Antithrombin-Aktivität erscheint somit ebenfalls wenig wahrscheinlich. Der hier nachgewiesene Anstieg der Antithrombin-Aktivität kann gegebenenfalls trotz akzeptabler inter-assay Variation durch einen Unterschied in den Kalibrationen bedingt sein, bei denen die Antithrombin-Aktivitäten der Normalkontrollen ebenfalls geringfügige Abweichungen zeigten (Messung nach 7 Monaten Lagerung: 107 % versus Messung nach 11 Monaten Lagerung: 117 %).

Hinsichtlich des Einfrierens und Auftauens von Plasma konnte in einer Arbeit sowohl für Hunde als auch für Katzen eine Beibehaltung der Aktivität der Koagulationsfaktoren und der physiologischen Inhibitoren Protein C und Antithrombin nachgewiesen werden (253). Die in der Literatur beschriebene signifikante Verkürzung der aPTT (251, 254) konnte in dieser Arbeit bei Katzen nicht bestätigt werden. Auch ein Abfall der FVIII-Aktivität, wie von Greene et al. (254) beschrieben, zeigte sich in dieser Arbeit bei Katzen nicht.

6.5 Referenzintervalle

Bei der in dieser Arbeit zur Referenzintervallermittlung verwendeten Methode handelt es sich um eine de novo Referenzintervallermittlung (207). Die geforderte Mindestanzahl ($n \geq 39$) zur Erstellung des 2,5 und 97,5 Perzentils (205, 231) wurde dabei mit 61 inkludierten Proben von Einzelkatzen erfüllt. Allerdings zeigten die Quotienten aus der Weite des Konfidenz- und Referenzintervalls (siehe Tabelle 8) bis auf den Parameter Antithrombin (und anti-Faktor Xa), dass mindestens einer der zwei Quotienten den empfohlenen Wert von 0,2 überstieg (209), so dass optimal mehr Katzen hätten eingeschlossen werden müssen (207). Andererseits sind die hier eingeschlossenen 60 bzw. 61 Katzen doppelt so viele oder mehr als doppelt so viele Tiere verglichen mit bisher bei der Katze durchgeführten Studien zur Referenzintervallermittlung hämostatischer Tests (siehe Tabelle 12). Auch wenn die Anwendung eines Quotienten aus der Weite des Referenzintervalls zur Weite des Konfidenzintervalls zur Bestätigung der Sicherheit ermittelter Referenzintervalle von der ASVCP empfohlen wird (207), ist dies in der Veterinärmedizin derzeit nicht üblich. Ein Vergleich der in dieser Dissertationsarbeit erhobenen Quotienten mit anderen Arbeiten ist somit nicht möglich.

Da die oberen Quotienten der aPTT, von FVIII und FXII nur eine geringe Überschreitung des Wertes 0,2 zeigten, können die Referenzintervalle dieser Parameter auch in Vergleich

mit der in anderen Studien deutlich niedrigeren Anzahl an inkludierten Tieren als sicher angesehen werden.

Die Überschreitung des Wertes 0,2 im oberen Quotienten von TT, PT und Fibrinogen kann weiterhin mit der rechtsschiefen Verteilung der Daten, wie im Histogramm zu sehen ist (Abbildung 7), zusammen hängen. Hier lässt sich das breitere obere Konfidenzintervall verglichen mit dem unteren Konfidenzintervall erkennen. Da der Quotient umso größer ist, je weiter das Konfidenzintervall (im Quotient im Zähler stehend), erklärt diese rechtsschiefe Verteilung den hohen oberen Quotienten bei diesen Parametern.

Eine geringe Limitation dieser Arbeit ist die Alters- und in geringerem Maße die Rasseverteilung der inkludierten Katzen, da die Richtlinien vorgeben, dass die Referenzpopulation der Altersverteilung jener Population entsprechen sollte, für welche die Referenzintervalle erstellt werden (207). Konkret beinhaltet dies die Gesamtpopulation an in einer Praxis oder Klinik vorgestellten Katzen. Da es sich, anders als beim Hund, bei einem Großteil aller als Haustiere gehaltenen Katzen um Mischlings-Katzen (hier: Europäisch-Kurzhaar oder Europäisch-Longhair) und nicht um Rasse-Katzen handelt, ist eine Referenzintervallermittlung basierend auf Europäisch-Kurzhaar Katzen empfehlenswert und stellt keine große Limitation dar. So haben demographische Studien gezeigt, dass der Anteil von Rasse-Katzen an einer englischen Population von 86.995 Katzen bei 10,4 % (255), an einer Population von 260 Katzen in Sydney bei 23,4 % (256) oder an einer Population von 504.688 Katzen in Schweden bei 23 % (257) lag. Allerdings sollte ein möglicher Rasse-Einfluss auf hämostatische Testergebnisse von Katzen weiterführend überprüft werden, da beispielsweise für einige Parameter der klinischen Chemie ein Einfluss der Rasse bei Katzen nachgewiesen werden konnte (258, 259). Statt einer Erstellung von Rasse-spezifischen Referenzintervallen, stellen insbesondere für seltene Rassen individuelle Referenzintervalle (Subjekt-basiert) eine gute Alternative dar, um signifikante Veränderungen früh zu bemerken (207, 226).

Die Altersverteilung der in dieser Dissertationsarbeit eingeschlossenen 61 Katzen muss als Limitation gewertet werden, da bis auf drei Katzen (10 Monate bei Blutentnahme) alle Tiere ein Alter zwischen 12 und 24 Monaten aufwiesen und somit als junge Adulte zu werten sind. In demographischen Studien konnte eine Altersverteilung zwischen 0 bis 26 Jahren mit einem Median bei 6,2 Jahren von 86.995 bei Tierärzten in England innerhalb

eines Jahres vorgestellten Katzen nachgewiesen werden (255). Eine Studie aus Australien mit 260 Katzen zeigte eine ähnliche Altersverteilung (Median: 6 Jahre; Minimum-Maximum: 0,25-22 Jahre) (256).

Die Population der Katzen dieser Dissertationsarbeit ist folglich jünger als der Median der englischen oder australischen Studie (255, 256). Ein Einfluss des Alters konnte bei Katzen bereits nachgewiesen werden für verschiedene klinische und labordiagnostische Parameter wie z. B. Blutdruck, Herzfrequenz, Thrombozytenzahl, Hämatokrit, Bilirubin-Konzentration oder Albumin-Konzentration (260), Serum-Kreatinin und Harnstoff (259) oder Cortisol (261). Daten hinsichtlich des Alterseinflusses auf Gerinnungsparameter sind bei der Katze bis jetzt nicht vorhanden. Bei Hunden unter 6 Monaten und zwischen 6 bis 12 Monaten konnten signifikant längere Zeiten für die aPTT und Fibrinogen nachgewiesen werden im Vergleich zu Hunden älter als 12 Monate (262). Im Gegensatz dazu konnte in einer humanmedizinischen Studie gezeigt werden, dass die Mittelwerte der Gerinnungstests PT, aPTT, Fibrinogen, Faktor VIII, Antithrombin und Protein S sich im Vergleich zwischen Kindern (Altersgruppen: 1-5 Jahre, 6-10 Jahre, 11-16 Jahre) und Erwachsenen (263) nicht signifikant unterschieden. In dieser humanmedizinischen Veröffentlichung konnte jedoch ein signifikanter Unterschied gezeigt werden für FXII, dessen Mittelwert in der Altersgruppe 11-16 Jahre signifikant niedriger war, als jener der Erwachsenen, sich in den jüngeren Altersgruppen (1-5 Jahre und 6-10 Jahre), jedoch nicht signifikant unterschied (263). Weiterhin war Protein C in dieser humanmedizinischen Studie bei Kindern aller Altersstufen (1-5 Jahre, 6-10 Jahre, 11-16 Jahre) signifikant niedriger als bei Erwachsenen, wobei ein Anstieg der Mittelwerte mit zunehmendem Alter beobachtet wurde (263). Sollten sich diese Ergebnisse der humanmedizinischen Studie auf die Katze übertragen lassen, ist folglich ein Unterschied in der Konzentration von Protein C zwischen Kitten, jungen Adulten und Katzen mittleren Alters möglich. Allerdings zeigten die hier eingeschlossenen und insgesamt jungen Katzen altersunabhängig eine verglichen mit dem Poolplasma normale (um 100 %) oder eine teils sehr hohe (> 300 %) Aktivität von Protein C, so dass ein altersbedingter Einfluss auf die Protein C-Aktivität unwahrscheinlich ist. Die Katzen mit einer hohen Protein C-Aktivität wiesen dabei ein gemitteltes Alter von 13,4 Monaten (Alter der 6 Katzen mit hoher Protein C-Aktivität in Monaten: 13, 13, 12, 12, 12, 22) und die Katzen mit der niedrigeren („normalen“) Protein C-Aktivität ein gemitteltes Alter von 16,4 Monaten auf.

Hinsichtlich der Anwendbarkeit der hier ermittelten Referenzintervalle auf geriatrische Katzen, zeigt ein Vergleich mit einer weiteren humanmedizinischen Studie, dass sich die menschliche Gerinnung im Alter teils verändert. So konnte ein stetiger Anstieg von Faktor VIII und Fibrinogen nachgewiesen werden bei Männern und Frauen in den Altersgruppen 25-34 Jahre, 35-44 Jahre, 45-54 Jahre, 55-64 Jahre und 65-74 Jahre (264). Zudem wurde ein signifikanter Anstieg der Konzentration von Protein C und Protein S bei Frauen mit zunehmendem Alter nachgewiesen (264). Auch wenn zwischen verschiedenen Altersgruppen statistisch signifikante Unterschiede gefunden wurden, erscheint eine klinische Signifikanz bei genauer Betrachtung der Zahlenwerte fraglich, so dass bis auf weiteres die hier ermittelten Referenzintervalle für Katzen jeden Alters genutzt werden können.

Wie in den Richtlinien der ASVCP empfohlen, war die Auswahl der statistischen Tests zur Ermittlung der Referenzintervalle von der Anzahl an Proben abhängig (207). Da für diese Arbeit 60 bzw. 61 Proben zur Referenzintervallermittlung zur Verfügung standen, wurde, wie bei normal verteilten Daten empfohlen, eine Robust-Methode verwendet (207). Die Referenzintervalle für nicht normal verteilte Daten wurden mittels einer nicht parametrischen Methodik erstellt, wobei das 90 %ige Konfidenzintervall mittels Bootstrap Methode bestimmt wurde (207), da die für die nicht parametrische Methode der Referenzintervallerstellung wünschenswerte Anzahl von 120 Proben (205, 207, 208) nicht gegeben war. Eine Anzahl (n) von Tieren mit $n < 120$ ist in veterinärmedizinischen Studien häufig zu beobachten (207), was auch durch die hohen Kosten und den zeitlichen Aufwand der Referenzintervallerstellung bedingt sein kann (208). Alternativ zu einer de novo Referenzintervallermittlung stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung wie die Übertragung (transference) und Verifizierung von bereits in anderen Laboratorien erstellten Referenzintervallen (207, 208), multizentrisch (in Zusammenarbeit verschiedener Labore) erstellte Referenzintervalle (207) sowie indirekte Methoden, bei denen die Referenzintervalle aus Werten in der medizinischen Datenbank bestimmt werden, wobei statistische Methoden genutzt werden, um zwischen Werten gesunder und vermutlich kranker Patienten zu unterscheiden (207).

Diskussion

Ein Vergleich eines Teils der hier ermittelten Referenzintervalle mit bereits veröffentlichten RIs bzw. dem Mittelwert der Resultate gesunder Katzen (*) ist in Tabelle 12 gezeigt.

Studie Test	Eigene Studie	Lutze, Kutschmann; 1991 (237) *	Killingsworth et al.; 1985 (211)		Lisciandro et al.; 1998 (162)	Stokol et al.; 2008 (178)	Brazzell et al.; 2007 (213)	Estrin et al.; 2006 (214)
Anzahl	60/61	15/10	20 (Haus- tier)	26 (Labor- tier)	6	30	30	20
TT (Sek)	14,1 – 19,6	21,6	12,2 – 16,5	15,1 – 20,5	5,0 – 8,0	k. A.	k. A.	k. A.
PT (Sek)	10,1 – 12,5	10,7	9,3 – 9,8	9,3 – 9,9	14,0 – 21,0	16,0 – 24,0	7,4 – 12,8	7,4 – 12,8
aPTT (Sek)	10,8 – 14,1	14,1	19,0 – 23,4	20,9 – 29,8	14,0 – 18,0	12,0 – 18,0	11,1 – 16,4	11,1 – 16,4
AT (%)	112 – 162 ⁺⁺	106,0 ⁺⁺	k. A.	k. A.	k. A.	56,0 – 223,0 †	96,0 – 142,0 ⁺ †	k. A.
FVIII (%)	56 – 124 ⁺	1390,0 ⁺⁺	k. A.	k. A.	k. A.	85,0 – 159,0 †	k. A.	k. A.
D- Dimere (µg/ml)	0,0 – 0,4	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	< 0,25 bis 1,0	< 0,2	k. A.
Fibrin- ogen (g/l)	1,0 – 2,6	1,4	1,6 – 2,3	1,1 – 1,7	k. A.	1,0 – 3,1	k. A.	k. A.

Tabelle 12: Vergleich der hier bestimmten Referenzintervalle mit bereits publizierten Referenzintervallen.

** = in der Studie lediglich Angabe des Mittelwertes, † = in Relation zu feline Poolplasma gemessen, †† = in Relation zu humanem Poolplasma oder mit humaner Standardkurve gemessen*

Abkürzungen: n = Probenanzahl, RI = Referenzintervall, k. A. = keine Angabe, TT = Thrombinzeit, PT = Prothrombinzeit, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, AT = Antithrombin, FVIII = Faktor VIII

Insgesamt wurden Referenzintervalle für Parameter der Gerinnung bei der Katze bisher recht selten erhoben und häufig mit weniger Katzen als von der ASVCP (mindestens $n \geq 39$ Tiere zur Erstellung des 2,5 und 97,5 Perzentils (205, 231)) empfohlen.

Für einen Vergleich der hier ermittelten Referenzintervalle mit bereits veröffentlichten Referenzintervallen müssen die verwendete Methode, die Reagenzien etc. ebenfalls in Betracht gezogen werden, da diese Faktoren die Ergebnisse beeinflussen können (237). Killingsworth et al. (211) haben in ihrer Studie 1985 ein Fibrometer verwendet und die Population weiter in als Haustier gehaltene Katzen und Laborkatzen eingeteilt. Bei einem Fibrometer handelt es sich um ein Gerät, welches das erste Auftreten eines Fibrinstranges detektiert (265). Die von Killingsworth et al. (211) ermittelten Werte der PT sind dabei bei beiden Populationen kürzer, als die hier ermittelten Werte. Umgekehrt verhielt es sich in einer Geräte-vergleichenden Studie aus der Humanmedizin, bei der das Fibrometer durchweg kürzere Zeiten in der PT ermittelte als das Vergleichsgerät, welche eine photoelektrische Messmethode verwendet (266). Die von Lutze und Kutschmann (237) an 15 Katzen ermittelten Werte (in der Tabelle ist der Mittelwert angegeben) für die PT und PTT entsprechen denen in dieser Dissertationsarbeit ermittelten Werten, wobei die angegebenen Mittelwerte der PT bei Lutze und Kutschmann am unteren Rand des hier ermittelten Referenzintervalls und die Mittelwerte der PTT im oberen Bereich des Referenzintervalls liegen. Anders verhielt sich die TT bei Lutze und Kutschmann (237), welche Mittelwerte deutlich oberhalb des in dieser Arbeit ermittelten Referenzintervalls detektierten. Der von Lutze und Kutschmann (237) gemessene Mittelwert der Fibrinogen-Konzentration liegt exakt im Bereich des in dieser Arbeit ermittelten Referenzintervalls. Insgesamt konnten Lutze und Kutschmann zeigen, dass Messergebnisse auch bei vergleichbarem Reaktionsprinzip stark divergieren können und dabei von der Art der Reagenzien einschließlich ihrer biologischen Quellen und Herstellungsverfahren abhängig

sind (237). Die von Lutze und Kutschmann (237) in Relation zu humanem Plasma (dem als Bezugswert eine Aktivität von 100 % zugesprochen wurde (237)) gemessene Faktor VIII-Konzentrationen liegt deutlich über 100 %, was den Werten von Mischke et al. (228) entspricht und die Notwendigkeit einer Anpassung dieses Tests auf die zu analysierende Spezies, wie in dieser Dissertationsarbeit erfolgt, verdeutlicht (237).

Die Referenzintervalle für Fibrinogen und die TT sind vergleichbar zwischen dieser Dissertationsarbeit und der Studie von Killingsworth et al. (211), wenn die bei Killingsworth et al. (211) getrennt aufgeführten Katzenpopulationen zusammen betrachtet werden. Die aPTT hingegen ist bei Killingsworth et al. (211) deutlich länger als die Zeiten dieser Arbeit, was durch die verschiedenen Aktivatoren (Extrakt aus Kaninchengehirn bei Killingsworth, Kaolin in dieser Arbeit) bedingt sein kann.

Lisciandro et al. (162) verwendeten eine manuelle Methode (manual tilt tube method), bei der die Fibrininformation im Teströhrchen, welches bei 37 °C im Wasserbad geschwenkt wird, optisch ermittelt wird (267). Diese Methode ergab deutlich unterschiedliche Referenzintervalle verglichen mit den hier ermittelten Referenzintervallen. Dies unterstreicht die Schwierigkeit der Referenzintervallermittlung durch Übertragung von bereits publizierten Daten anderer Studien oder von Referenzintervallen anderen Laboratorien, die nur bei vergleichbarer Methodik übernommen werden sollten (268).

Das von Brazzell et al. (213) detektierte Referenzintervall der Messergebnisse der PT deckt sich mit dem hier ermittelten Referenzintervall bei weiterer Spannweite. Die aPTT ist bei Brazzell et al. (213) geringfügig (um ungefähr eine Sekunde) nach oben verschoben. Für beide Tests wurden andere Reagenzien verwendet als in dieser Arbeit, was die Verschiebungen erklären kann. Für die Messungen von Antithrombin und den D-Dimeren wurden bei Brazzell et al. (213) die gleichen Reagenzien und das gleiche Analysegerät wie in dieser Arbeit verwendet, was einen Vergleich begünstigt. Die Antithrombin-Werte von Brazzell et al. (213) waren dabei geringfügig niedriger, was durch die niedrigere Anzahl an Katzen in der Studie von Brazzell et al. (213) bedingt sein kann. Die D-Dimer Werte von Brazzell et al. (213) zeigten im Vergleich zu dieser Dissertationsarbeit ähnliche Ergebnisse. Die von Estrin et al. (214) ermittelten Werte für die PT und die aPTT zeigten jeweils breiter gestreute Referenzintervalle sowie für die aPTT geringfügig längere Zeiten. Die breitere Spannweite der Referenzintervalle kann dabei durch die niedrige Probenanzahl (n = 20) bedingt sein. Zudem können andere Reagenzien verwendet worden sein. Wie

auch in dieser Dissertationsarbeit verwendeten Estrin et al. (214) den STA Compact® (Stago) als Analysegerät.

In der Arbeit von Stokol et al. (178) erfolgte die Messung der PT und der aPTT ebenso wie in dieser Arbeit am STA Compact® (Stago), allerdings unter Verwendung verschiedener Reagenzien, was die bei Stokol et al. (178) ermittelten höheren Werte erklären kann.

Die Fibrinogenwerte, bei Stokol et al. (178) ebenfalls mit der Methode nach Clauss allerdings mit felinelem anstatt humanem Kalibrationsplasma gemessen, sind vergleichbar in beiden Studien.

Die Antithrombin-Aktivität, die in beiden Studien chromogen unter Verwendung des gleichen Reagenz bestimmt wurde, zeigt bei Stokol et al. (178) eine deutlich größere Spannweite. Dies kann der Methodik geschuldet sein, da die Antithrombin-Aktivität bei Stokol et al. (178) in Relation zu felinelem Poolplasma angegeben wurde, was in Kontrast zu der Methodik dieser Arbeit steht, wo Antithrombin mittels humaner Standardkurve gemessen wurde. Weiterhin kann die niedrigere Anzahl an Probanden bei Stokol et al. (178) zu diesem Unterschied beitragen.

Die D-Dimer Messung erfolgte bei Stokol et al. (178) und in dieser Arbeit mit unterschiedlichen Methoden (immunturbidimetrische Messung versus Latex-Agglutinationstest) und ergab bei Stokol et al. (178) eine breite Spanne an Messergebnissen, die bis zu 1,0 µg/ml reichten. Möglicherweise kann dies durch die unterschiedliche Methodik bedingt sein.

Die in beiden Arbeiten als modifizierte aPTT gemessene und in Relation zu gepooltem Plasma gesunder Katzen angegebene Aktivität des Faktor VIII zeigt bei Stokol et al. (178) um ca. 30 % höhere Werte bei gleicher Spannbreite der Werte. Ein ähnliches Ergebnis lieferten Mischke et al. (216), die eine Faktor VIII-Aktivität von 72-124 % zeigten, ermittelt anhand von 58 Katzen in Relation zu einem Poolplasma, das mit Plasma von 50 Katzen erstellt wurde. Auch das bei Hunden detektierte Referenzintervall (227) (2,5 bis 97,5 Perzentil, ermittelt an 56 gesunden Hunden) für die Faktor VIII-Aktivität zeigt Ergebnisse (70,9 % – 136,4 %), die denen von Stokol et al. (178) und Mischke et al. (216) ähneln. Die Ursache für den Unterschied zwischen dieser Dissertationsarbeit und den oben genannten Studien liegt wahrscheinlich in der Kalibration der Messung der Faktor VIII-Aktivität. Obwohl den aus unverdünntem Poolplasma gemessenen Qualitätskontrollen

eine Aktivität von 100 % zugesprochen wurde und die Kalibrationen eine akzeptable Linearität aufwiesen, lagen die Ergebnisse der Qualitätskontrollen häufig zwischen 70 % und 80 % (unverdünnte Kontrollmessungen: Tag 1: 81 %, Tag 2: 84 %, Tag 3: 97 %, Tag 4: 73 %, Tag 5: 71 %). Daher ist es nicht verwunderlich, dass das hier ermittelte RI für FVIII in diesem Bereich liegt.

Das für FXII ermittelte Referenzintervall liegt im Bereich um 100 % und entspricht somit den Erwartungen. Obwohl es sich bei dem Faktor XII Mangel um den häufigsten Faktormangel bei Katzen handelt (133), wurden nur selten Referenzintervalle für diesen Faktor veröffentlicht. Eine Studie ermittelte ein Referenzintervall (2.5-97.5 Perzentil) zwischen 51 % und 142 % anhand von 58 Katzen unter Verwendung eines Pools bestehend aus Plasma von 50 Katzen (216). Diese Werte sind bis auf die breitere Weite des Referenzintervalls vergleichbar mit den hier ermittelten Werten (62,1 – 130,7 %).

Eine Arbeit in der Humanmedizin ermittelte Referenzintervalle (Mittelwert plus 2-fache Standardabweichung) für die Faktor XII-Aktivität von 40 % bis 190 % (269). Eine weitere humanmedizinische Studie zeigte einen Mittelwert von 99,4 % bei einer Verteilungsbreite von 45 – 186 % (270). Der Vergleich von feliner Faktor XII-Aktivität zu humaner Faktor XII-Aktivität ist allerdings nur eingeschränkt möglich, da - wie bereits von Lutze und Kutschmann nachgewiesen und in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt - Katzen eine ca. dreifach erhöhte Faktor XII-Aktivität in Relation zu humanem Plasma aufweisen, so dass Plasmaverdünnungen durchgeführt werden müssen, die je nach Verdünnung in verschiedenen Arbeiten zu unterschiedlichen Werten führen können (237). Weiterhin fielen Lutze und Kutschmann eine überproportionale Abnahme der Faktor XII-Aktivität innerhalb der Verdünnungsreihe auf, die einen Vergleich innerhalb verschiedener Studien erschwert und eine konstante Messmethodik essentiell macht (237).

Die im Rahmen dieser Dissertation gemessene anti-Faktor Xa-Aktivität lag zwischen 0,0 und 0,1 UI/ml. Es wurde bei 8 Katzen ein Wert unter 0 gemessen. Da dies der Logik widerspricht, wurden diese 8 Werte auf 0 gesetzt. Eine ähnliche Grundkonzentration bzw. ein ähnliches Grundrauschen der anti-Faktor Xa-Aktivität von 0,05 bis 0,13 U/ml berichteten Alwood et al. (218) bei Messungen an 10 Katzen. Auch Vargo et al. (217) konnten in ihrer Arbeit an 8 nicht mit Heparin behandelten Katzen Werte zwischen 0,0 und 0,04 U/ml ermitteln. Die Werte dieser Arbeit sind somit vergleichbar mit bereits

publizierten Werten von Katzen. Um dieses Grundrauschen zu vermindern, empfehlen Alwood et al. (218) die Verdünnungen innerhalb des Tests anzupassen (218).

Die im Rahmen dieser Dissertation ermittelte Ratio der Resistenz gegen aktiviertes Protein C (APC-R Ratio) zeigt ein Referenzintervall zwischen 2,0 und 3,7. Ähnliche Werte (2,0 -3,0) ermittelten Bauer et al. (230) an 56 gesunden Hunden. In der Humanmedizin wird ein normales Ansprechen auf aktiviertes Protein C bei einer Ratio von $\geq 2,17$ (157) erwartet bzw. ein Nachweis der Erkrankung (APC-Resistenz) bei einer Ratio von $< 2,1$ gewährleistet (271). Hinsichtlich der klinischen Relevanz dieses Parameters sind weitere Studien an Tieren mit thrombotischen Erkrankungen notwendig.

Bei Betrachtung der ermittelten Referenzintervalle der physiologischen Inhibitoren Protein C und Protein S fällt die große Spannweite des Referenzintervalls auf sowie die große Spanne des oberen Konfidenzintervall, welches die Unsicherheit der oberen Grenze des Referenzintervalls ausdrückt. Zudem fällt bei der Betrachtung der Datenverteilung und der Histogramme beider Parameter auf, dass es zwei getrennte Populationen zu geben scheint.

Dies kann durch die niedrige Anzahl an Katzen ($n = 10$), aus deren Plasma der Pool hergestellt wurde, bedingt sein, da es möglich ist, dass innerhalb dieser kleinen Gruppe die Konzentrationen der Werte ähnlich hoch bzw. tief waren und die Kontrolle somit keine repräsentativen 100 % widerspiegelt. Bei einer größeren Anzahl an Katzen hätte der Pool eine breitere Streuung aufweisen können. Allerdings ist der Abstand zwischen den Populationen (Protein C: keine Messung zwischen 153 % und 306 %) ebenfalls ungewöhnlich hoch, so dass in Betracht gezogen werden muss, dass es sich tatsächlich um zwei verschiedene Gruppen von Katzen handelt: solche mit tiefer (bzw. „normaler“) Aktivität von Protein C und Protein S und solche mit einer hohen Aktivität.

Die Theorie, dass Katzen innerhalb der Blutgerinnung in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können, wurde bereits von Cöl et. al (272) aufgestellt, in deren Arbeit am Thrombelastogramm klinisch gesunder Tiere ($n = 31$) zwei verschiedene Fibrinolyse-Gruppen nachgewiesen werden konnten. Die tiefere Gruppe zeigte dabei Werte, die mit Werten anderer Tierarten vergleichbar waren und somit als „normal“ betitelt wurden (272). Die hohe Gruppe mit schneller Lyse zeigte zudem signifikant kürzere Reaktionszeiten, welche den enzymatischen Teil der Gerinnung widerspiegeln (272).

Diskussion

Bei genauerer Betrachtung der Messergebnisse von Protein C zeigen 7 Katzen (7/61) Werte, die über 300 Prozent hinausgehen und durch die statistische Methode nach Tukey als Ausreißer eingestuft wurden. Ungewöhnlich für Ausreißer wäre allerdings wiederum die Verteilung der Daten bzw. der große Abstand zwischen den Populationen (zwischen 153 % und 306 % kein Messergebnis, wobei die 6 als Ausreißer markierten Werte wiederum in einem recht eng gefassten Bereich liegen (Prozentzahlen (%): 306, 315, 315, 315, 320, 372, 400)). Der höchste dieser Werte hat sich ebenfalls in einer Nachmessung einige Monate später bestätigt (Tabelle 7).

Eine andere Möglichkeit stellt ein analytischer durch die Kalibration bedingter Fehler dar, bei dem durch die Anwendung von Verdünnungen maßgebliche Effekte entstehen können (Abbildung 9). Auch wenn die Tests hinsichtlich einer Linearität kalibriert wurden, behandelte diese Kalibration keine Konzentrationen im Bereich von 300 %, so dass eine fehlende Linearität der Messungen bei höheren Konzentrationen und somit falsche (falsch hohe) Werte möglich sind. Ungewöhnlich hierfür wäre allerdings wiederum der breite Abstand zwischen den Populationen, da selbst bei exponentieller Verteilung von Werten, die über 120 % hinausgehen, Werte zwischen 153 % und 306 % zu erwarten gewesen wären.

Bereits veröffentlichte Referenzintervalle der Katze hinsichtlich des physiologischen Inhibitors Protein C sind derzeit kaum vorhanden, so dass neben einem eingeschränkten Spezies-internem Vergleich nachfolgend (Tabelle 13) ein Spezies-übergreifender Vergleich mit dem Hund aufgezeigt ist.

Studie	Spezies	Probandenzahl	Referenzintervall	Einheit
Eigene Studie	Katze	61	103 – 385	% bezogen auf Katzenpoolplasma
Conner et al. (182), RI etabliert in Comparative Coagulation Laboratory, Cornell University, Ithaca (273)	Katze	k. A.	65 – 120	% bezogen auf Katzenpoolplasma
Eralp (227)	Hund	56	76 – 119	% bezogen auf Hundepoolplasma
de Laforcade et al. (5)	Hund	30	75 – 135	% bezogen auf Hundepoolplasma

Tabelle 13: Vergleich der Referenzintervalle (2,5 bis 97,5 Perzentil) von Protein C mit Studien beim Hund.

[‡] = 5 bis 95 Perzentil

Abkürzungen: RI = Referenzintervall, k. A. = keine Angabe

Das am Comparative Coagulation Laboratory (Animal Health Diagnostic Center, Cornell University, Ithaca, NY) etablierte Referenzintervall kann nur eingeschränkt zu einem Vergleich herangezogen werden, da weder die Probandenzahl zur Referenzintervallerstellung noch die Messmethodik angegeben sind. Das Referenzintervall scheint allerdings deutlich niedriger als die im Rahmen dieser Dissertation ermittelten Werte und ähnlicher zu bisher publizierten Daten beim Hund. Die Studie an Hunden von Eralp (227) erfolgte mit der gleichen Messmethodik wie in dieser Dissertationsarbeit an Katzen.

Dieser Vergleich bekräftigt, dass die Spanne der in dieser Arbeit bei Katzen ermittelten Referenzintervalle für Protein C ungewöhnlich hoch ist. Ein möglicher Grund hierfür kann in der von Cöl et al. (272) aufgestellten Theorie der verschiedenen Blutgerinnungs-„Typen“ bei Katzen liegen, wobei die tiefe Population bei Cöl et al. (272) vergleichbar war mit Werten anderer Tierarten. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde nachfolgend für

die tiefe Population (Protein C-Werte bis 153 %) ein eigenes Referenzintervall (Tabelle 14, Abbildung 11) mittels nicht parametrischer Methode und Konfidenzintervalle mittels Bootstrap-Methode bestimmt.

RI (%)	90 % CI unten	WCI/WRI unten	90 % CI oben	WCI/WRI oben
101 – 149	95 – 111	0,37	142 – 149	0,16

Tabelle 14: Berechnete Referenzintervalle und Konfidenzintervalle für die tiefe Population (Werte unter 300 %) von Protein C.

Abkürzungen: RI = Referenzintervall, CI = Konfidenzintervall, WRI = Weite des Referenzintervalls, WCI = Weite des Konfidenzintervalls

Die Weite des Referenzintervalls bei alleiniger Betrachtung der tiefen Population von Protein C ist ebenso wie das Referenzintervall der tiefen Population für sich betrachtet vergleichbarer mit den für Hunde und Menschen ermittelten Referenzintervallen. Zu beachten ist dabei der Quotient der Weite des unteren Konfidenzintervalls zur Weite des Referenzintervalls ($WCI/WRI \text{ unten} > 0,2$), welcher auf die Unsicherheit dieser Grenze hinweist, wobei der Quotient der Weite des oberen Konfidenzintervalls zur Weite des Referenzintervalls im Gegensatz zum vorherigen, alle Katzen inkludierenden Referenzintervall den empfohlenen Wert $< 0,2$ erfüllt.

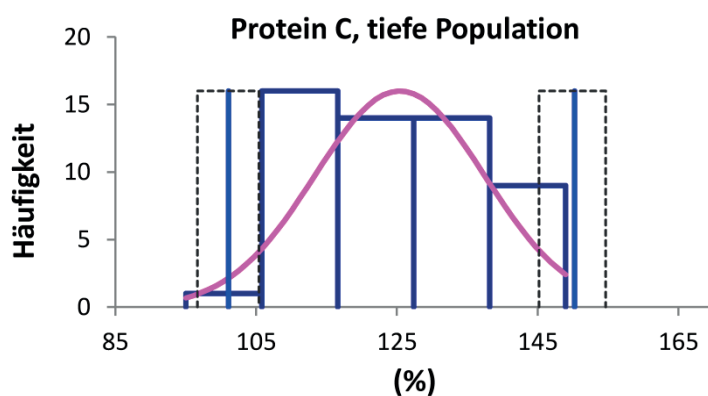


Abbildung 11: Histogramm der Datenverteilung der tiefen Population von Protein C.

Die hellblaue solide Linie zeigt das Referenzintervall. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt das 90 %ige Konfidenzintervall. Die pink Linie entspricht der Gauß'schen Verteilungskurve.

Die Theorie, dass Katzen in zwei getrennte Populationen bezüglich des Verhaltens ihrer Gerinnungsaktivität eingeteilt werden können, kann ebenfalls für Protein S angewendet

werden. Sowohl Werte der „hohen Population“ (Werte ab 200 %) als auch der „tiefen Population“ (Werte bis 150 %) von Protein S wurden nachgemessen, wobei sich alle (insgesamt 14) Werte bestätigten (Tabelle 7).

Ebenso wie für Protein C kann auch für Protein S anhand der durchgeführten Kalibration keine Aussage zur Linearität in dem hohen Messbereich gefällt werden. Somit kann es sich hier ebenfalls wie bei Protein C bei den hohen Ergebnissen um falsch hoch gemessene Werte handeln. Andererseits ist hier ebenfalls ungewöhnlich, dass kein Messergebnis zwischen 148 % und 209 % aufgetreten ist. Weiterhin muss ein Einfluss der inter-assay Impräzision auf die Messergebnisse in Betracht gezogen werden, die bei Protein S mit 21 % recht hoch war und hinsichtlich der Erstellung von Referenzintervallen den Vergleich von an unterschiedlichen Tagen gemessenen Werten erschweren kann. Da sich alle Werte in der Nachmessung von Protein S (siehe Tabelle 9) trotz unterschiedlicher Kalibrationen bestätigen (keine Abweichung von > 20 % zwischen den Werten), kann der Einfluss der inter-assay Variation insgesamt vernachlässigt werden. Bei großem Einfluss der inter-assay Variation auf die Messergebnisse wäre zudem zu erwarten, dass die Werte derjenigen Messtage, die trotz unterschiedlicher Kalibrationen ähnliche Ergebnisse in der Qualitätskontrolle mit dem Tag der Nachmessungen zeigten, die besten Übereinstimmungen mit der Nachmessung aufwiesen (Nachmessungen durchgeführt an Tag 6; Übereinstimmung der Qualitätskontrolle des unverdünnten Poolplasmas mit Tag 6 in absteigender Reihenfolge: Tag 4, Tag 3, Tag 2, Tag 5, Tag 1; siehe Abbildung 5). Dies konnte hier allerdings nicht bestätigt werden (siehe Tabelle 9), was einen großen Einfluss der inter-assay Variation ausschließt.

Wenn man nach der Theorie von Cöl et al. (272) die Ergebnisse von Protein S in zwei Populationen auftrennt, ergibt sich eine annähernd gleiche Anzahl an Tieren pro Gruppe (29 Tiere in der tiefen Gruppe, 32 Tiere in der hohen Gruppe). Die „tiefe Population“ zeigt dabei eine linksschiefe Verteilung (Abbildung 12) sowie nach BoxCox Transformation eine annähernde Normalverteilung (Abbildung 13).

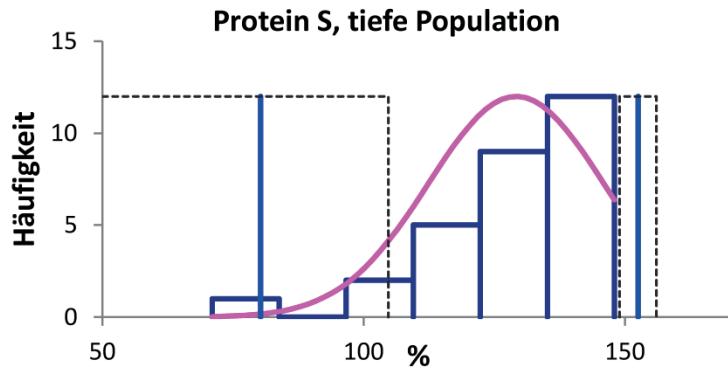


Abbildung 12: Histogramm der Verteilung nicht transformierter Daten der tiefen Population von Protein S.

Die hellblaue solide Linie zeigt das Referenzintervall. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt das 90 %ige Konfidenzintervall. Die pinke Linie entspricht der Gauss'schen Verteilungskurve. Die Datenverteilung ist hierbei linksschief.

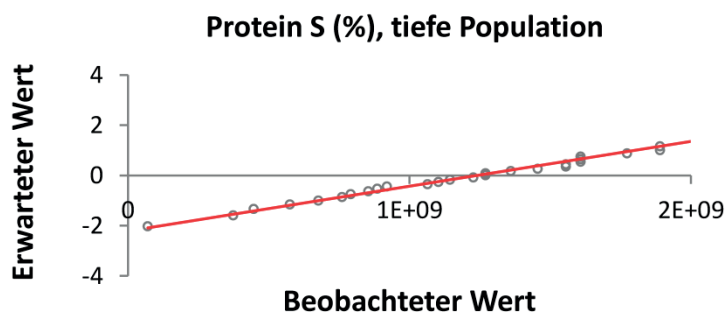


Abbildung 13: Quantil-Quantil Plot der tiefen Population von Protein S nach BoxCox-Transformation.

Die einzelnen Punkte zeigen in ihrer Lage auf der Geraden eine Normalverteilung an.

Die Datenverteilung in der „hohen Population“ entspricht annähernd einer Normalverteilung, was in Abbildung 14 dargestellt ist.

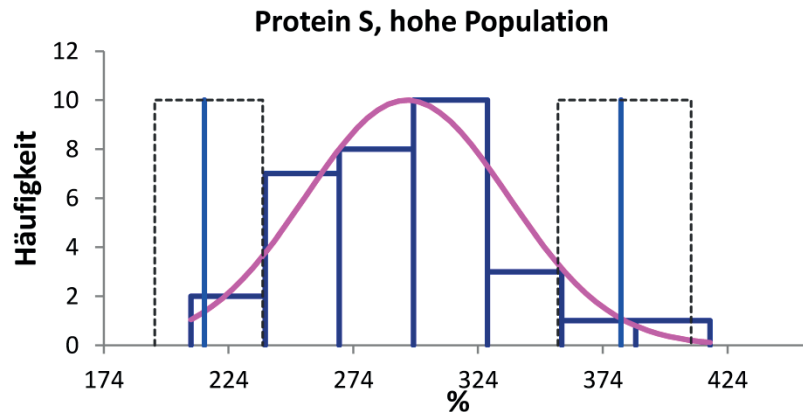


Abbildung 14: Histogramm der Verteilung nicht transformierter Daten der hohen Population von Protein S.

Die hellblaue solide Linie zeigt das Referenzintervall. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt das 90 %ige Konfidenzintervall. Die pinke Linie entspricht der Gauss'schen Verteilungskurve.

Da beide Populationen weniger als 40 Tiere enthalten, ist die Ermittlung von Referenzintervallen jeder einzelnen Population nur eingeschränkt möglich. Wie von den ASVCP Richtlinien empfohlen, wurden die in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 15) angezeigten Referenzintervalle für die beiden Subpopulationen von Protein S mittels Robust-Methode berechnet und die 90 %igen Konfidenzintervalle bestimmt (207). Die „tiefe Population“ erhielt dabei eine BoxCox Transformation während das Referenzintervall der „hohen Population“ aus untransformierten Daten ermittelt wurde. Mittelwerte und Mediane wurden jeweils aus untransformierten Daten berechnet.

	RI	90 % CI unten	90 % CI oben	Mittelwert	Median
Protein S (%), tiefe Population	80 – 153	N.D. – 105	149 – 156	129	133
Protein S (%), hohe Population	209 – 378	187 – 237	352 – 402	296	294

Tabelle 15: Referenzintervalle, 90 %igen Konfidenzintervalle (CI) sowie Mittelwerte und Mediane der hohen und tiefen Population von Protein S.

Abkürzungen: RI = Referenzintervall, CI = Konfidenzintervall, N.D. = nicht definiert

Diskussion

Da ein Spezies-interner Vergleich der Referenzintervalle mangels vergleichbarer Studien nicht möglich ist, wird in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 16) ein Spezies-übergreifender Vergleich von Protein S mit Hund und Mensch aufgezeigt.

	Eigene Studie			Eralp (227)	Dykes et al. (274)		Lowe et al. (264)	
	gesamt	tiefe Popu- lation	hohe Popu- lation					
Spezies	Katze			Hund	Mensch, Mann	Mensch, Frau	Mensch, Mann	Mensch, Frau
Proben-anzahl	61	29	32	56	2106	1682	576	633
RI	88 – 388 [‡]	80 – 153 [‡]	209 – 378 [‡]	74 – 161 [‡]	72 – 164 [‡]	57 – 148 [‡]	72 – 163 ^{‡‡}	47 – 156 ^{‡‡}
Einheit	% *			% **	% ***		% ***	

Tabelle 16: Vergleich der Referenzintervalle des physiologischen Inhibitors Protein S mit Studien bei Hund und Mensch.

* = Angabe in % des felines Poolplasmas

** = Angabe in % des caninen Poolplasmas

*** = Angabe in % des humanen Poolplasmas

‡ = 2,5 bis 97,5 Perzentil

‡‡ = 5 bis 95 Perzentil

Die von Eralp (227) genutzte Messmethodik entspricht ebenso wie das genutzte Gerät und die verwendeten Reagenzien denen dieser Dissertationsarbeit. In der Studie von Dykes et al. (274) wurden die Konzentrationen von Protein S mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay ermittelt. Lowe et al. (264) verwendeten wie für die Bestimmung von Protein S einen automatischen Test (ACL 300 Research coagulometer, Instrumentation Laboratory, Warrington) unter Benutzung der Reagenzien des Herstellers.

Wie bereits bei Protein C diskutiert, zeigt sich ebenfalls bei Protein S, dass nach Auftrennung der Katzen in zwei Populationen (tiefe und hohe Werte) das Referenzintervall der tiefen Population vergleichbar ist mit den bei Hunden und

Menschen ermittelten Referenzintervallen, wie von Cöl et al. (272) hinsichtlich der Fibrinolyse-Gruppen berichtet. Somit scheinen Katzen nicht nur in verschiedene Fibrinolyse-Gruppen, sondern ebenfalls in verschiedene „Inhibitor-Gruppen“ (tiefe Konzentration versus hohe Konzentration) eingeteilt werden zu können.

Aufgrund der großen Spanne des in dieser Arbeit ermittelten Referenzintervalls für Protein C und Protein S bei Katzen ohne Auftrennung in verschiedene Subpopulationen, erscheinen einmalige Messungen bei kranken Patienten wenig sinnvoll. Auch eine Zuteilung von gesunden Katzen in eine „Inhibitor-Gruppe“ ist anhand eines einmalig gemessenen Wertes weder sicher möglich noch empfehlenswert. Für diese Tests wäre eine Bestimmung des Reference Change Values (219) sinnvoll, anhand dessen im Verlauf bei Messungen eines Patienten beurteilt werden kann, ob ein Anstieg bzw. ein Absinken eines Parameters für diesen Patienten als physiologische intraindividuelle Variation oder als pathologisch beurteilt werden muss.

6.6 Geschlechtervergleich

Dass die Hämostase durch das Geschlecht bzw. durch Geschlechtshormone beeinflusst wird, ist aus der Humanmedizin bekannt (269, 271, 264, 275). Hinsichtlich des Einflusses des Geschlechts muss für diese Studie berücksichtigt werden, dass es sich bei den eingeschlossenen Katzen um kastrierte Tiere handelt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine signifikant höhere Antithrombin-Konzentration bei weiblichen Tieren verglichen mit männlichen Tieren ermittelt. Dies entspricht bisher veröffentlichten Daten aus der Humanmedizin, wo gezeigt werden konnte, dass die Antithrombin-Aktivität bei postmenopausalen Frauen höher ist als bei Männern gleichen Alters (276, 277).

Die in dieser Arbeit nachgewiesene signifikant längere Prothrombinzeit bei weiblichen verglichen mit männlichen Katzen, konnte bereits in einer Studie an Ratten und Mäusen gezeigt werden (278). Dabei fiel in der Arbeit von Lemini et al. (278) die bei weiblichen Tieren (Ratten und Mäuse) verlängerte Prothrombinzeit verglichen mit männlichen Tieren auf wobei innerhalb der weiblichen Tiere unkastrierte Mäuse und Ratten eine längere Prothrombinzeit als ovariectomisierte Tieren zeigten.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Dissertation eine bei weiblichen Tieren signifikant kürzere Thrombinzeit als bei männlichen Tieren nachgewiesen werden. Gleiches zeigten Lemini et al. (278) für Mäuse. Bei Ratten hingegen konnten Lemini et al. (278) das Gegenteil beweisen, eine signifikant höhere Thrombinzeit bei weiblichen Ratten (unkastriert und ovariohysterektomiert) verglichen mit männlichen Ratten. Dies weist auf die Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies hin und somit auch auf die Notwendigkeit, Spezies-spezifische Daten zu erheben.

Die Unterschiede von Antithrombin, der Thrombinzeit und Prothrombinzeit bei männlichen und weiblichen Katzen sind zwar signifikant, allerdings führen sie nicht wie von Sinton et al. (235) beschrieben zu einem Mittelwertsunterschied, der 25 % des Referenzintervalls überschreitet, so dass hier auch nicht von klinischer Signifikanz auszugehen ist und keine Geschlechts-spezifischen Referenzintervalle angegeben werden sollten.

Die übrigen untersuchten Gerinnungszeiten und Faktoren dieser Dissertation wiesen keinen signifikanten Unterschied im Geschlechtervergleich auf. Dies entspricht bereits veröffentlichten Daten vom Hund (227).

In der Literatur konnte zudem bei weiblichen Mäusen und Ratten signifikant niedrigere Werte für die aktivierte partielle Thromboplastinzeit verglichen mit männlichen Tieren gezeigt werden (278). Aus der Humanmedizin ist weiterhin bekannt, dass die D-Dimer-Konzentration bei Frauen höher als bei Männern ist (279). Auch die APC-R Ratio bei Frauen zeigte sich niedriger als bei Männern (271). Für Protein C (277) konnte ebenso wie für Protein S (totales und freies Protein S) (274) eine höhere Konzentration bei Männern als bei Frauen detektiert werden, die in beiden Geschlechtern jedoch insbesondere bei Frauen mit dem Alter anstieg, so dass Lowe et al. (264) eine höhere Protein C-Konzentration bei Frauen in den Altersgruppen 45-54 Jahre, 55-64 Jahre und 65-74 Jahre als bei Männern der gleichen Altersgruppe nachweisen konnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Männer eine geringgradig niedrigere Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, VII, X, IX, und XII als Frauen aufwiesen (264, 269). Ähnliches wies eine Arbeit beim Hund nach, in der gezeigt wurde, dass unkastrierte Weibchen eine größere Aktivität der Faktoren V und II zeigten als die männlichen Tiere (280). Ähnliche Studien für die Katze liegen zurzeit nicht vor.

7. Zusammenfassung

Literaturübersicht: Referenzintervalle (RIs) schaffen die labordiagnostische Grundlage zur Erforschung hämostatischer Erkrankungen. Dabei sind insbesondere thrombotische bzw. thromboembolische Zustände sowie ihre Risikofaktoren Gegenstand veterinärmedizinischer Untersuchungen. Informationen und RIs bezüglich der physiologischen Inhibitoren der Gerinnung bei der Katze sind rar, so dass Ziel dieser prospektiven Studie eine de novo Referenzintervallermittlung unter besonderer Berücksichtigung der physiologischen Inhibitoren Antithrombin, Protein C und Protein S war. Gleichzeitig erfolgte eine Methodvalidierung hinsichtlich der analytischen Variation (Wiederholbarkeit, Interferenzen, Stabilität) und des Einflusses des Geschlechts als Teil der biologischen Variation.

Material und Methoden: Im Februar und Juni 2014 sowie im September 2015 wurde von 62 klinisch gesunden Europäisch-Kurzhaar Katzen Bayer Animal Health GmbH (Leverkusen, Deutschland) Citratblut gewonnen, wobei die Ergebnisse von 61 dieser 62 Katzen für die Referenzintervallermittlung eingeschlossen wurden (29 kastrierte Katzen, 32 kastrierte Kater; Alter: zwischen 10 und 22 Monaten, Mittelwert: 16 Monate). Untersucht wurden die Tests Prothrombinzeit (PT), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), Thrombinzeit (TT), Resistenz gegen aktiviertes Protein C (APC-R), Fibrinogen, D-Dimere, anti-Faktor Xa (aFXa), Antithrombin (AT), Protein C (PC), Protein S (PS) sowie die Faktoren XII (FXII) und VIII (FVIII). Alle Analysen der untersuchten Parameter erfolgten am automatischen Gerinnungsanalysegerät STA Compact® (Stago Germany, Düsseldorf, Deutschland). Die Messungen der Parameter PC, PS, FXII und FVIII wurden für die Katze angepasst unter Erstellung einer Katzen-spezifischen Kalibrationskurve unter Verwendung von vier seriellen Verdünnungsstufen eines felines Poolplasmas. In der Referenzintervallerstellung wurden die Ergebnisse dieser Parameter anhand dieser felines Kalibration gemessen und mit Poolplasma von 10 klinisch gesunden Europäisch-Kurzhaar Katzen der Bayer Animal Health GmbH (5 kastrierte Kater, 5 kastrierte Katzen; Alter zwischen 18 und 50 Monaten, Mittelwert: 33,4 Monate), dem jeweils eine Aktivität von 100 % zugesprochen wurde, verglichen.

Zusammenfassung

Die Methodenvalidierung beinhaltete eine Überprüfung der intra-assay und inter-assay Wiederholbarkeit sowie den Einfluss interferierender Substanzen (Lipämie, Hämolyse). Der intra-assay Variationskoeffizient (VC) wurde mittels 10-fach wiederholter Messung aus dem Poolplasma innerhalb eines Tages erhoben. Der inter-assay VC wurde berechnet anhand der Werte der Qualitätskontrollen, die an jedem Messtag ($n = 6$) bestimmt wurden. Als Qualitätskriterium hinsichtlich der Akzeptabilität galt der absolut zulässige Fehler (TE_a), der nicht überschritten werden sollte ($VC_{\text{intra-assay}} < TE_a$; $VC_{\text{inter-assay}} < TE_a$). Mangels Informationen über einen Katzen-spezifischen TE_a hämostatischer Tests wurden Daten aus der Humanmedizin verwendet.

Der Einfluss der interferierenden Größen wurde bestimmt unter Verwendung zweier Konzentrationen (Lipämie: 10 mg/ml und 2,5 mg/ml; Hämolyse: 5 mg/ml und 1,25 mg/ml) der interferierenden Substanz im Vergleich zu einer Kontrolle, der anstatt der interferierenden Substanz die gleiche Menge sterilen Natrium-Chlorids zugefügt wurde. Der Mittelwertsunterschied (Bias) zwischen den Ansätzen mit Störsubstanz und der Kontrolle wurde daraufhin berechnet und als Qualitätskriterium mit dem TE_a (unter Verwendung humanmedizinischer Daten) verglichen, wobei kein Einfluss der Störsubstanz nachweisbar war, wenn $\text{Bias} < TE_a$.

Als Teil der biologischen Variation wurde zudem ein Geschlechts-bedingter Unterschied der Ergebnisse überprüft. Hinsichtlich einer klinischen Signifikanz wurde ein Mittelwertsunterschied zwischen den Geschlechtern, der 25 % des RI übersteigen musste, festgelegt.

Statistik: Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel 2010 während die Referenzintervalle mit dem Software-Programm Reference Value Advisor 2.1 (Biostatistiques, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Frankreich) mittels Robust-Methode (TT, PT, aPTT, APC-R Ratio und FVIII) teils mit vorheriger Box-Cox Transformation oder nicht parametrischer Methode (FXII, AT, PC, PS, D-Dimere, Fibrinogen, aFXa) erfolgte. Für den Geschlechtervergleich wurde ein ungepaarter t-Test bei normal verteilten Daten (APC-R Ratio, FVIII, FXII) oder ein Mann-Whitney Test bei nicht normal verteilten Daten (TT, PT, aPTT, AT, PC, PS, Fibrinogen, D-Dimere, aFXa) in der Software GraphPad Prism 7.02 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA 92037 USA) genutzt.

Ergebnisse: Es konnten folgende RIs ermittelt werden:

PT: 10,1- 12,5 Sek, aPTT: 10,8 – 14,1 Sek; TT: 14,1 – 19,6 Sek; APC-R Ratio: 2,0 – 3,7; PC = 103 – 385 %; PS: 88 – 388 %; AT: 112 – 162 %; FVIII: 56 – 124 %; FXII: 62 -131 %; aFXa: 0,0- 0,1 UI/ml; D-Dimere: 0,0 – 0,4 µg/ml; Fibrinogen: 1,0 – 2,6 g/l.

Die Parameter PC und PS zeigten dabei eine zweigeteilte Datenverteilung, wobei die Werte jeweils einer tiefen (PC: Werte bis 153 %; PS: Werte bis 148 %) und einer hohen Population (PC: Werte ab 306 %; PS: Werte ab 209 %) zugeordnet werden konnten. Alle Katzen mit hoher Protein C-Aktivität wiesen dabei ebenfalls eine hohe Protein S-Aktivität auf.

In der Methodvalidierung erfüllten alle Parameter das Akzeptabilitätskriterium hinsichtlich der intra-assay Wiederholbarkeit. Dabei lagen die Variationskoeffizienten von PC, PS, FVIII, APC-R Ratio, TT, PT, aPTT, AT und FXII: ≤ 3 % während die intra-assay Variationskoeffizienten von Fibrinogen bei 5 % und der D-Dimere bei 18 % lagen.

Bei der Untersuchung der inter-assay Wiederholbarkeit lagen die Variationskoeffizienten der aPTT, PT und von PS geringgradig über den jeweiligen Wertes des humanmedizinischen TE_a (aPTT: 6 %; PT: 5 %; PS: 21 %). Auch der inter-assay VC von FVIII überstieg den humanmedizinischen TE_a (FVIII: 13 %). Die Parameter PC, AT, D-Dimere und Fibrinogen erfüllten das Akzeptabilitätskriterium (PC: 8 %; AT: 6 %; D-Dimere: 8 %; Fibrinogen: 7%).

Die Untersuchungen zum Einfluss von Interferenzen zeigte, dass eine Lipämie (bei 10 mg/ml sowie bei 2,5 mg/ml) sowie eine Hämolyse (bei 5 mg/ml sowie bei 1,25 mg/ml) einen Einfluss auf die Messung der D-Dimere und von aFXa haben, die in der hohen Konzentration lipämischen Plasmas nicht mehr messbar waren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine starke Hämolyse (5 mg/ml) einen Einfluss auf die Messung von Antithrombin hat, die zur Überschreitung des Akzeptabilitätskriteriums führte.

Hinsichtlich des Einflusses des Geschlechts waren bei der Messung von AT, PT und TT signifikante Unterschiede nachweisbar, wobei Katzen eine kürzere Thrombinzeit ($p = 0,0016$), eine längere Prothrombinzeit ($p = 0,024$) und eine höhere Antithrombin-Aktivität ($p = 0,0071$) aufwiesen als Kater. Da diese Unterschiede nicht zu einem Mittelwertsunterschied führten, der 25 % des RI überschritt, waren sie als klinisch nicht relevant einzustufen.

Schlussfolgerung: Die hier ermittelten RIs können abgesehen von Protein C und Protein S zukünftig als populationsbasierte RIs zur Unterscheidung zwischen Gesundheit und Krankheit herangezogen werden. Aufgrund der breiten Spanne der Ergebnisse von PC und PS sind diese anhand einer gesunden Population von Katzen erhobenen RIs für den klinischen Alltag nicht nutzbar. Hier ist die Verwendung intraindividueller RIs bzw. die Betrachtung der Änderung von Ergebnissen im Verlauf anzuraten. Ungewöhnlich war weiterhin die zweigeteilte Population in der Datenverteilung von Protein C und Protein S, aufgrund derer die Theorie aufgestellt werden konnte, dass Katzen in zwei verschiedene Gruppen der Inhibitoren (PC und PS) eingeteilt werden können: solche mit hoher und solche mit normaler Aktivität. Dies sollte in weiteren Studien überprüft werden.

In der Methodvalidierung wurden hinsichtlich der Wiederholbarkeit über einen kurzen sowie einen langen Zeitraum zufriedenstellende Ergebnisse erzielt, die zwar teils geringfügig oberhalb des TE_a lagen (als Grenzwert für die Akzeptabilität), der hier verwendete TE_a jedoch mangels veterinärmedizinischer Daten aus der Humanmedizin entnommen wurde und somit nicht als absoluter Grenzwert sondern eher als Richtwert zu sehen ist. Hinsichtlich des Einflusses interferierender Substanzen wurde ein Einfluss einer Lipämie auf die Messung der D-Dimere und aFXa sowie ein Einfluss einer Hämolyse auf die Messung der D-Dimere, aFXa und bei Verwendung hoher Konzentrationen ebenfalls auf AT nachgewiesen.

Ein Einfluss des Geschlechts konnte für die TT, PT und AT nachgewiesen werden, erwies sich jedoch als klinisch nicht relevant.

8. Summary

Background: Reference intervals (RIs) serve as a basis for laboratory research concerning hemostatic diseases. Lately, thrombophilic or thromboembolic states and risk factors leading to these conditions stand in the focus of veterinary investigations. Regarding the physiologic inhibitors of coagulation, information and RIs for cats are rare.

The aim of this study was a de Novo determination of RIs including components of secondary and tertiary hemostasis with particular focus on the inhibitors antithrombin, protein C and protein S. Additionally, a validation of methods concerning the analytical variation (imprecision and interferences) and the influence of sex (as part of the biological variation) were performed.

Material and methods: For the determination of RIs, 61 clinically healthy cats (European shorthair, 29 spayed females, 32 spayed males; age: 10 to 22 months, average: 16 months) of Bayer Animal Health GmbH (Leverkusen, Germany) were included.

RIs were determined for the following assays: prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), thrombin time (TT), resistance against activated protein C (APC-R), fibrinogen, d-dimers, anti-factor Xa, antithrombin (AT), protein C (PC), protein S (PS), factor XII (FXII) and factor VIII (FVIII). All analyses were performed on the automated coagulation analyzer STA Compact® (Stago Germany, Düsseldorf, Germany).

Therefore, measurements of PC, PS, FXII and FVIII needed to be modified for the cat by usage of a feline-specific calibration curve, which was created on the basis of 4 serial dilutions of feline pooled plasma. For the determination of RIs of these assays, samples were measured using this feline calibration curve and compared to a pool of feline plasma (consisting of 10 clinically healthy cats of Bayer Animal Health GmbH; 5 spayed males, 5 spayed females; age: 18 to 50 months, average: 33,4 months), which was set to be having 100 % activity.

Method validation included the intra-assay and inter-assay variation as well as the influence of interfering substances (lipemic or hemolytic samples).

The coefficient of variation (CV) of the intra-assay repeatability was recorded by a 10-fold repeated measurement out of pooled plasma during one single day. The inter-assay CV was calculated using the results of the quality control, which was performed on every day

Summary

measurements were taken ($n = 6$). Regarding the acceptability, the total error allowable (TE_a) was used as criterion, which was not to be exceeded ($CV_{\text{intra-assay}} < TE_a$; $CV_{\text{inter-assay}} < TE_a$). Lacking veterinary (and feline-specific) data for TE_a of hemostatic tests, these values were taken from human medicine.

The influence of interfering substances was determined using two concentrations (lipemia: 10 mg/ml und 2.5 mg/ml; hemolysis: 5 mg/ml und 1.25 mg/ml) and compared to a control, which the same amount of sterile sodium chloride instead of the interfering substance has been added to. The mean difference (bias) between the samples containing interfering substances and the control was then calculated and set to be acceptable, when the bias did not exceed the TE_a (human data) as acceptability criterion. Regarding the biological variation, the influence of sex was determined and considered to be clinically relevant if the mean difference between the sexes exceeded 25 % of the RI.

Statistics: The statistics were performed using Microsoft Excel 2010 while RIs were determined using the software Reference Value Advisor 2.1 (Biostatistiques, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France) by means of a robust method (TT, PT, aPTT, APC-R ratio und FVIII) with or without Box-Cox transformation or a non-parametric method (FXII, AT, PC, PS, D-dimers, fibrinogen, aFXa).

The influence of sex was determined with the software GraphPad Prism 7.02 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA 92037 USA) using an unpaired t-test for normally distributed data (APC-R ratio, FVIII, FXII) or Mann-Whitney test for not normally distributed data (TT, PT, aPTT, AT, PC, PS, fibrinogen, D-dimers, aFXa).

Results: The following RIs were determined:

PT: 10,1- 12,5 sec, aPTT: 10,8 – 14,1 sec; TT: 14,1 – 19,6 sec; APC-R ratio: 2,0 – 3,7; PC = 103 – 385 %; PS: 88 – 388 %; AT: 112 – 162 %; FVIII: 56 – 124 %; FXII: 62 -131 %; aFXa: 0,0- 0,1 UI/ml; d-dimers: 0,0 – 0,4 $\mu\text{g/ml}$; fibrinogen: 1,0 – 2,6 g/l

In the data distribution, PC and PS were divided in two groups: one group showing normal values (PC: up to 153 %; PS: up to 148 %) and the other group showing high activities (PC: values from 306 %; PS: values from 209 %). Thereby, each cat with a high PC activity also had a high PS activity.

In the method validation study, all assays proofed to be acceptable regarding the intra-assay variation (PC, PS, FVIII, APC-R Ratio, TT, PT, aPTT, AT, FXII: ≤ 3 %; fibrinogen: 5 %; d-

dimers: 18 %). The inter-assay CVs of aPTT, PT, PS and FVIII exceeded the human TE_a (aPTT: 6 %; PT: 5 %; PS: 21 %; FVIII: 13 %) while the inter-assay CVs of PC (8 %), AT (6 %), d-dimers (8 %) and fibrinogen (7 %) were acceptable.

As interfering substances, lipemia (at 10 mg/ml and 2,5 mg/ml) as well as hemolysis (at 5 mg/ml and 1,25 mg/ml) was shown to influence the measurement of d-dimers and aFXa, which could not be measured in the highly concentrated lipemic sample. Furthermore, hemolysis (at 5 mg/ml) was shown to influence the measurement of antithrombin resulting in a bias exceeding the TE_a .

Regarding the influence of sex, AT, PT and TT were significantly different between females and males. Female cats showed a shorter TT ($p = 0.0016$), a longer PT ($p = 0.024$) and a higher AT-activity ($p = 0.0071$) than male cats. These differences were still not clinically relevant, since the mean difference did not exceed 25 % of the reference interval.

Conclusion: The de Novo determined RIs can help the clinician differentiate between disease and health for all assays except for PC and PS. Because of the wide range of the RI and the data distribution of these two parameters, the determined RI is not useful for standard clinical practice. The unusual two-parted distribution lets the theory arise, that cats have different inhibitor-activities: some cats show normal activities whereas others show high activities. The clinical or laboratory relevance of this finding should be investigated in further studies.

In the method validation, the intra-assay CV and inter-assay CV were satisfactory even if the inter-assay CV of some tests exceeded the TE_a (set to be the threshold value as acceptability criterion). Still, the values for the TE_a were taken from human medicine and thus, should be interpreted as benchmark rather than threshold.

Both lipemia and hemolysis were proven to interfere with the measurement of d-dimers and aFXa. Furthermore, highly concentrated hemolytic samples influenced the AT measurement.

An influence of sex could be demonstrated, which, however, turned out to be clinically irrelevant.

9. Literaturverzeichnis

1. Macfarlane RG. Normal and abnormal blood coagulation: a review. J CLIN PATH 1948; 1(3):113–43.
2. Virchow R. Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin: Meidinger; 1856. (Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin).
3. Konečný F. Thromboembolic conditions, aetiology diagnosis and treatment in dogs and cats. ACTA VET BRNO 2010; 79(3):497–508.
4. Knoebl P. Blood coagulation disorders in septic patients. WIEN MED WOCHENSCHR 2010; 160(5-6):129–38.
5. Laforcade AM de, Freeman LM, Shaw SP, Brooks MB, Rozanski EA, Rush JE. Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. J VET INTERN MED 2003; 17(5):674–9.
6. Stefanini M. Basic mechanisms of hemostasis. B NEW YORK ACAD MED 1954; 30(4):239–77.
7. Troy GC. An overview of hemostasis. VET CLIN N AM-SMALL 1988; 18(1):5–20.
8. Smith JW, Day TK, Mackin A. Diagnosing bleeding disorders. COMP CONT EDUC PRACT 2005; 27(11):828.
9. Fearnley GR. A concept of natural fibrinolysis. LANCET 1961; 277:992–994.
10. Hawiger J. Formation and regulation of platelet and fibrin hemostatic plug. HUM PATHOL 1987; 18(2):111–22.
11. Delvos U, Müller-Berghaus G. Die Regulation der Blutgerinnung. NATURWISSENSCHAFTEN 1985; 72(9):461–9.
12. Henry RL, Steiman RH. Mechanisms of hemostasis. MICROVASC RES 1968; 1:68–82.
13. Brandt JT. Current concepts of coagulation. CLIN OBSTET GYNECOL 1985; 28(1):3–14.
14. Bauer N, Moritz A. Coagulopathies in the dog and cat. TIERARZTL PRAX K H 2008; 36(4):235.
15. Hoffman M., Monroe D. M. Monroe III. A cell-based model of hemostasis. THROMB HAEMOSTASIS 2001; (85):958–65.

16. McMichael M. Primary hemostasis. J VET EMERG CRIT CARE 2005; (15):1–8.
17. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. ANNU REV MED 1996; 47:315–31.
18. Smith SA. Overview of hemostasis. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, editors. Schalm's Veterinary Hematology. 6. edition. New York, NY: John Wiley & Sons; 2011. p. 635–53.
19. Broos K, Feys HB, Meyer SF de, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. BLOOD REV 2011; 25(4):155–67.
20. Weksler BB, Marcus AJ, Jaffe EA. Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. PROC NATL ACAD SCI USA 1977; 74(9):3922–6.
21. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. NATURE 1987; 327(6122):524–6.
22. Marcum JA, McKenney JB, Rosenberg RD. Acceleration of thrombin-antithrombin complex formation in rat hindquarters via heparinlike molecules bound to the endothelium. J CLIN INVEST 1984; 74(2):341–50.
23. Marcum JA, Rosenberg RD. Heparinlike molecules with anticoagulant activity are synthesized by cultured endothelial cells. BIOCHEM BIOPHYS RES COMM 1985; 126(1):365–72.
24. Lollar P, Owen WG. Clearance of thrombin from circulation in rabbits by high-affinity binding sites on endothelium. Possible role in the inactivation of thrombin by antithrombin III. J CLIN INVEST 1980; 66(6):1222–30.
25. Esmon NL, Owen WG, Esmon CT. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. J BIOL CHEM 1982; (2):859–64.
26. Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. J BIOL CHEM 1982; (14):7944–7947.
27. Esmon C. The regulation of natural anticoagulant pathways. SCIENCE 1987; 235(4794):1348–52.

28. Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *PROC NATL ACAD SCI USA* 1981; 78(4):2249–52.
29. Novotny WF. Tissue factor pathway inhibitor. *SEMIN THROMB HEMOST* 1994; 20(1):101–8.
30. Willard MD, Tvedten H. Labordiagnostik in der Kleintierpraxis. 1. Auflage. München: Urban & Fischer; 2006.
31. Tschopp TB, Weiss HJ, Baumgartner HR. Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrands disease. *J LAB CLIN MED* 1974; 83(2):296–300.
32. Turitto VT, Weiss HJ, Baumgartner HR. Platelet interaction with rabbit subendothelium in von Willebrand's disease: altered thrombus formation distinct from defective platelet adhesion. *J CLIN INVEST* 1984; 74(5):1730–41.
33. Brockway WJ, Fass DN. The nature of the interaction between ristocetin-Willebrand factor VIII coagulant activity molecule. *J LAB CLIN MED* 1977; 89(6):1295–305.
34. Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW. Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J CLIN INVEST* 1977; 60(2):390–404.
35. Gentry PA. Comparative aspects of blood coagulation. *VET J* 2004; 168(3):238–51.
36. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *ARTERIOSCL THROM VAS* 2004; 24(6):1015–22.
37. Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *BLOOD* 2008; 111(3):981–6.
38. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *NEW ENGL J MED* 2007; 357(24):2482–94.
39. Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test: The Application in haemophilia and thrombocytopenia. *J CLIN PATH* 1953; 6(1):3–8.
40. Stockham SL, Scott MA. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. 2nd edition. Ames, Iowa: Blackwell Pub.; 2008.
41. Batty P, Smith JG. Haemostasis. *SURGERY* 2010; 28(11):530–5.

42. Schwarz HP, Heeb MJ, Wencel-Drake JD, Griffin JH. Identification and quantification of protein S in human platelets. BLOOD 1985; 66(6):1452–5.
43. Esmon NL, Carroll RC, Esmon CT. Thrombomodulin blocks the ability of thrombin to activate platelets. J BIOL CHEM 1983; 258(20):12238–42.
44. Weiss HJ, Rogers J. Thrombocytopathia due to abnormalities in platelet release reaction - studies on six unrelated patients. BLOOD 1972; 39(2):187–96.
45. Jandrey KE. Assessment of platelet function. J VET EMERG CRIT CARE 2012; 22(1):81–98.
46. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. NATURE 1964; 202(4931):498–9.
47. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. SCIENCE 1964; 145(3638):1310–2.
48. Hemker HC, Kahn M. J. P. Reaction sequence of blood coagulation. NATURE 1967; (215):1201–2.
49. Jackson CM, Yale Nemerson. Blood coagulation. ANNU REV BIOCHEM 1980; 49:765–811.
50. Bach RR. Initiation of coagulation by tissue factor. CRC CRIT REV BIOCHEM 1988; 23(4):339–68.
51. Rapaport SI, Rao LV. Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. ARTERIOSCLER THROMB 1992; 12(10):1111–21.
52. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. PROC NATL ACAD SCI USA 1977; 74(12):5260–4.
53. Osterud B, Berre A, Otnaess AB, Bjorklid E, Prydz H. Activation of the coagulation factor VII by tissue thromboplastin and calcium. BIOCHEMISTRY 1972; 11(15):2853–7.
54. Kisiel W, Ericsson LH, Davie EW. Proteolytic activation of protein C from bovine plasma. BIOCHEMISTRY 1976; 15(22):4893–900.

55. Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *BLOOD* 1995; 86(5):1794–801.
56. Colman RW. Surface-mediated defense reactions. The plasma contact activation system. *J CLIN INVEST* 1984; 73(5):1249–53.
57. Kaplan AP, Silverberg M, Dunn JT, Miller G. Mechanisms for hageman factor activation and role of hmw kininogen as a coagulation cofactor. *ANN NY ACAD SCI* 1981; 370(1):253–60.
58. Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *NEW ENGL J MED* 1992; 326(12):800–6.
59. Griffin JH, Cochrane CG. Recent advances in the understanding of contact activation reactions. *SEMIN THROMB HEMOST* 1979; 5(4):254–72.
60. Suttie JW, Jackson CM. Prothrombin structure, activation, and biosynthesis. *PHYSIOL REV* 1977:1–70.
61. DeLoughery TG. Basics of coagulation. In: DeLoughery TG, editor. *Hemostasis and Thrombosis*. Third edition. Cham: Springer; 2015. p. 1–7.
62. Lowe GDO, Rumley A, Mackie IJ. Plasma fibrinogen. *ANN CLIN BIOCHEM* 2004; 41(Pt 6):430–40.
63. Doolittle RF. Fibrinogen and Fibrin. In: Fullerlove G, editor. *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group; 2002-2007.
64. Lorand L, Konishi K. Activation of the fibrin stabilizing factor of plasma by thrombin. *ARCH BIOCHEM BIOPHYS* 1964; 105(1):58–67.
65. Buluk K, Januszko T, Olbromski J. Conversion of fibrin to desmofibrin. *NATURE* 1961; 191(4793):1093–4.
66. Pisano JJ, Finlayson JS, Peyton MP. Cross-link in fibrin polymerized by factor XIII: ϵ -(γ -glutamyl)lysine. *SCIENCE* 1968; 160(3830):892–3.
67. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *NEW ENGL J MED* 1999; 340(6):448–54.

68. Broze GJ, JR. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. BLOOD COAGUL FIBRIN 1995; 6(1):7–13.
69. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. ARTERIOSCL THROM VAS 2007; 27(8):1687–93.
70. Dahlbäck B. Blood coagulation. LANCET 2000; 355(9215):1627–32.
71. Bick RL. The clinical significance of fibrinogen degradation products. SEMIN THROMB HEMOST 1982; 8(4):302–30.
72. Olsson PI, Johnsson H. Interference of acetyl salicylic acid, heparin and fibrinogen degradation products in haemostasis of reptilase-defibrinogenated dogs. THROMB RES 1972; 1(2):135–46.
73. Fletcher AP, Alkjaersig N, Sherry S. Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic ("fibrinolytic") states. I. The significance of fibrinogen proteolysis and circulating fibrinogen breakdown products. J CLIN INVEST 1962; 41:896–916.
74. Alkjaersig N, Fletcher AP, Sherry S. Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic ("fibrinolytic") states. II. The significance, mechanism and consequences of defective fibrin polymerization. J CLIN INVEST 1962; 41:917–34.
75. Deykin D, Cochios F, DeCamp G, Lopez A. Hepatic removal of activated factor X by the perfused rabbit liver. AM J PHYSIOL 1968; 214(2):414–9.
76. Tollefsen DM, Majerus DW, Blank MK. Heparin cofactor II: Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. J BIOL CHEM 1982; 257(5).
77. Walker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein: A possible function for bovine protein S. J BIOL CHEM 1980; 255(12):5521–4.
78. Vijaya Mohan Rao L, Rapaport SI. Studies of a mechanism inhibiting the initiation of the extrinsic pathway of coagulation. BLOOD 1987; (69):645–51.
79. Prowse CV, Esnouf MP. The isolation of a new warfarin-sensitive protein from bovine plasma. BIOCHEM SOC TRANS 1977:255–6.

80. Broze GJ, JR, Miletich JP. Human protein Z. J CLIN INVEST 1984; 73(4):933–8.
81. Yin ZF, Huang ZF, Cui J, Fiehler R, Lasky N, Ginsburg D et al. Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. PROC NATL ACAD SCI USA 2000; 97(12):6734–8.
82. Han X, Fiehler R, Broze GJ. Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor. PROC NATL ACAD SCI USA 1998; 95(16):9250–5.
83. Heck LW. Substrates of hageman factor: I. isolation and characterization of human factor XI (PTA) and inhibition of the activated enzyme by alpha1-antitrypsin. J EXP MED 1974; 140(6):1615–30.
84. Scott CF, Schapira M, James HL, Cohen AB, Colman RW. Inactivation of factor XIa by plasma protease inhibitors. J CLIN INVEST 1982; 69(4):844–52.
85. Howell WH, Holt E. Two new factors in blood coagulation - heparin and pro-antithrombin. AM J PSYCHOL 1918:328–41.
86. Quick AJ. The normal antithrombin of the blood and its relation to heparin. AM J PSYCHOL 1938:712–9.
87. Abildgaard U. Purification of two progressive antithrombins of human plasma. SCAND J CLIN LAB INV 1967; 19:190–5.
88. Kurachi K, Schmer G, Hermodson MA, Teller DC, Davie EW. Characterization of human, bovine, and horse antithrombin III. BIOCHEMISTRY 1976; 15(2):368–73.
89. Kubier A, O'Brien M. Endogenous anticoagulants. TOP COMPANION ANIM MED 2012; 27(2):81–7.
90. Yin ET, Wessler S, Stoll PJ. Identity of plasma-activated factor X inhibitor with antithrombin III and heparin cofactor. J BIOL CHEM 1971; 246(11):3712–9.
91. Rosenberg JS, McKenna PW, Rosenberg RD. Inhibition of human factor IXa by human antithrombin. J BIOL CHEM 1975; 250(23):8883–8.
92. Rosenberg RD. Heparin, antithrombin, and abnormal clotting. ANNU REV MED 1978:367–78.

93. Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, Hendrycx S, Caron C, Rime A et al. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. CHEST 1992; 101(3):816–23.
94. Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. HAEMOPHILIA 2008; 14(6):1229–39.
95. Kuzi S, Segev G, Haruvi E, Aroch I. Plasma antithrombin activity as a diagnostic and prognostic indicator in dogs: a retrospective study of 149 dogs. J VET INTERN MED 2010; 24(3):587–96.
96. Waugh DF, Fitzgerald MA. Quantitative aspects of antithrombin and heparin in plasma. AM J PHYSIOL 1955; 184(3):627–39.
97. Quick AJ. On the coagulation defect in peptone shock: A consideration of antithrombins. AM J PSYCHOL 1936:535–42.
98. Yurt RW, Leid RW, JR., Austen KF. Native heparin from rat peritoneal mast cells. J BIOL CHEM 1977; 252(2):518–21.
99. Ögren S, Lindahl U. Degradation of heparin in mouse mastocytoma tissue. BIOCHEM J 1971; 125(4):1119–29.
100. Marcum JA, Atha DH, Fritze LMS, Nawroth P, Stern D, Rosenberg RD. Cloned bovine aortic endothelial cells synthesize anticoagulant active heparan sulfate proteoglycan. J BIOL CHEM 1986; 261(16):7507–17.
101. Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein: Purification from bovine plasma and preliminary characterization. J BIOL CHEM 1976; 251(2):355–63.
102. Esmon CT, Jackson CM. A new vitamin K-dependent protein: a phospholipid-binding zymogen of a serine esterase. J BIOL CHEM 1976; 251(10):3052–6.
103. Comp PC, Esmon CT. Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs. J CLIN INVEST 1981; 68(5):1221–8.
104. Kisiel W, Canfield WM, Ericsson LH, Davie EW. Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. BIOCHEMISTRY 1977; 16(26):5824–31.

105. Comp PC, Jacocks RM, Ferrell GL, Esmon CT. Activation of protein C in vivo. J CLIN INVEST 1982; 70(1):127–34.
106. Bereczky Z, Kovács KB, Muszbek L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. CLIN CHEM LAB MED 2010; 48 Suppl 1:66.
107. Fisher CJ, Yan SB. Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases. CRIT CARE MED 2000; 28(Supplement):S49-S56.
108. Vehar GA, Davie EW. Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor). BIOCHEMISTRY 1980; 19(3):401–4010.
109. Oliver JA. Activated protein C cleaves factor Va more efficiently on endothelium than on platelet surfaces. BLOOD 2002; 100(2):539–46.
110. Triplett DA. Coagulation and bleeding disorders: review and update. CLIN CHEM 2000:1260–9.
111. Sakata Y, Curriden S, Lawrence D, Griffin JH, Loskutoff DJ. Activated protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases antiactivator activity. PROC NATL ACAD SCI USA 1985; 82(4):1121–5.
112. Di Scipio RG, Hermodson MA, Yates SG, Davie EW. A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. BIOCHEMISTRY 1977; 16(4):698–706.
113. Stenflo J, Jönsson M. Protein S, a new vitamin K-dependent protein from bovine plasma. FEBS LETT 1979; 101(2):377–81.
114. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. J BIOL CHEM 1993; 268(4):2872–7.
115. Scharfstein J. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. J EXP MED 1978; 148(1):207–22.
116. Dahlbäck B, Stenflo J. High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. PROC NATL ACAD SCI USA 1981; 78(4):2512–6.

117. Hackeng TM, Sere KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *PROC NATL ACAD SCI USA* 2006; 103(9):3106–11.
118. Rosing J, Maurissen, L. F. A., Tchaikovski SN, Tans G, Hackeng TM. Protein S is a cofactor for tissue factor pathway inhibitor. *THROMB RES* 2008; 122:S60-S63.
119. Kasthuri RS, Glover SL, Boles J, Mackman N. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor as key regulators of global hemostasis: measurement of their levels in coagulation assays. *SEMIN THROMB HEMOST* 2010; 36(7):764–71.
120. Wiman B, Collen D. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *NATURE* 1978; 272(6):549–50.
121. Christensen L. R., MacLeod C. M. A proteolytic enzyme of serum: characterization, activation and reaction with inhibitors. *J GEN PHYSIOL* 1945; 28(6):559–83.
122. Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *CELL* 1988; 53(4):505–18.
123. Rijken DC, Wijngaards G, Welbergen J. Immunological characterization of plasminogen activator activities in human tissues and body fluids. *J LAB CLIN MED* 1981; 97(4):477–86.
124. Holemans R, Roberts HR. Hageman factor and in vivo activation of fibrinolysis. *J LAB CLIN MED* 1964; 64:778–86.
125. Iatridis SG, Ferguson JH. Active Hageman factor: a plasma lysokinase of the human fibrinolytic system. *J CLIN INVEST* 1962; 41:1277–87.
126. Colman RW. Activation of plasminogen by human plasma kallikrein. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMM* 1969; 35(2):273–9.
127. Alkjaersig N, Fletcher AP, Sherry S. The mechanism of clot dissolution by plasmin. *J CLIN INVEST* 1959; 38(7):1086–95.
128. Pizzo SV, Taylor Jr. LM, Schwartz ML, Hill RL, McKee PA. Subunit structure of fragment D from fibrinogen and cross-linked fibrin. *J BIOL CHEM* 1973; 248(13):4584–90.

129. Quinn DA, Fogel RB, Smith CD, Laposata M, Thompson BT, Johnson SM et al. D-dimers in the diagnosis of pulmonary embolism. AM J RESP CRIT CARE MED 1999; 159:1445–9.
130. Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. BLOOD 1991; (78):3114–24.
131. Kier AB, Bresnahan JF, White FJ, Wagner JE. The inheritance pattern of factor XII (Hageman) deficiency in domestic cats. CAN J COMP MED 1980; 44(3):309–14.
132. Green RA, White F. Feline factor XII (Hageman) deficiency. AM J VET RES 1977; 38(6):893–5.
133. Brooks M, DeWilde L. Feline factor XII deficiency. COMP CONT EDUC PRACT 2006; 28(2):148–56.
134. Kohn B. Disorders of hemostasis in cats (Part II - secondary hemostatic disorders). KLEINTIERPRAXIS 2008; 53(2):105–10.
135. Cotter SM, Brenner RM, Dodds WJ. Hemophilia A in three unrelated cats. J AM VET MED ASSOC 1978; 172(2):166–8.
136. Johnstone IB, Morton JC, Allen DG. Factor VIII deficiency in a cat. CAN VET J 1987; (28):671–3.
137. Maggio-Price L, Dodds WJ. Factor-IX deficiency (hemophilia-B) in a family of british shorthair cats. J AM VET MED ASSOC 1993; 203(12):1702–4.
138. Goree M, Catalfamo JL, Aber S, Boudreaux MK. Characterization of the mutations causing hemophilia B in 2 domestic cats. J VET INTERN MED 2005; 19(2):200–4.
139. Dillon AR, Boudreaux MK. Combined factors IX and XII deficiencies in a family of cats. J AM VET MED ASSOC 1988; 193(7):833–4.
140. Littlewood JD, Evans RJ. A combined deficiency of factor VIII and contact activation defect in a family of cats. BRIT VET J 1990; 146(1):30–5.
141. Lutze G, Kutschmann K, Furst K, Schneppenheim R. Combined hemophilia B (factor IX deficiency) and factor XII reduction in a male crossbreed cat. BERL MUNCH TIERARZTL WOCHENSCHR 2005; 118(5-6):255–60.

142. Troxel MT, Brooks MB, Esterline ML. Congenital factor XI deficiency in a domestic shorthair cat. *J AM ANIM HOSP ASSOC* 2002; 38(6):549–53.
143. Gookin JL, Brooks MB, Catalfamo JL, Bunch SE, Munana KR. Factor X deficiency in a cat. *J AM VET MED ASSOC* 1997; 211(5):576.
144. Aird WC. Natural anticoagulant inhibitors: activated protein C. *BEST PRACT RES CLIN HAEMATOL* 2004; 17(1):161–82.
145. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J CLIN INVEST* 1981; 68(5):1370–3.
146. Seligsohn U, Berger A, Abend M, Rubin L, Attias D, Zivelin A et al. Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn. *NEW ENGL J MED* 1984; 310(9):559–62.
147. Miletich J, Sherman L, Broze G, JR. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *NEW ENGL J MED* 1987; 317(16):991–6.
148. Allaart CF, Poort SR, Reitsma PH, Bertina RM, Briët E, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect. *LANCET* 1993; 341(8838):134–8.
149. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *BLOOD* 1984; 64(6):1297–300.
150. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J CLIN INVEST* 1984; (74):2082–8.
151. Comp PC. Laboratory evaluation of protein S status. *SEMIN THROMB HEMOST* 1990; 16(2):177–81.
152. Filip DJ, Eckstein JD, Veltkamp JJ. Hereditary antithrombin III deficiency and thromboembolic disease. *AM J HEMATOL* 1976; 1(3):343–9.
153. Rodgers GM. Role of antithrombin concentrate in treatment of hereditary antithrombin deficiency. An update. *THROMB HAEMOSTASIS* 2009; 101(05):806–12.
154. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated

protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. PROC NATL ACAD SCI USA 1993; 90(3):1004–8.

155. Zöller B, Dahlbäck B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. LANCET 1994; 343(8912):1536–8.

156. Dahlbäck B. The discovery of activated protein C resistance. J THROMB HAEMOST 2003; 1(1):3–9.

157. Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR, Ronde H de, Briët E, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. LANCET 1993; 342(8886-8887):1503–6.

158. Aoki N, Moroi M, Sakata Y, Yoshida N, Matsuda M. Abnormal plasminogen. A hereditary molecular abnormality found in a patient with recurrent thrombosis. J CLIN INVEST 1978; 61(5):1186–95.

159. Schnyder M, Di Cesare A, Di Basso W, Guscetti F, Riond B, Glaus T et al. Clinical, laboratory and pathological findings in cats experimentally infected with *Aelurostrongylus abstrusus*. PARASITOL RES 2014; 113(4):1425–33.

160. Center SA, Warner K, Corbett J, Randolph JF, Erb HN. Proteins invoked by vitamin K absence and clotting times in clinically ill cats. J VET INTERN MED 2000; 14(3):292–7.

161. Mayhew PD, Holt DE, McLearn RC, Washabau RJ. Pathogenesis and outcome of extrahepatic biliary obstruction in cats. J SMALL ANIM PRACT 2002; 43(6):247–53.

162. Lisciandro SC, Hohenhaus A, Brooks M. Coagulation abnormalities in 22 cats with naturally occurring liver disease. J VET INTERN MED 1998; 12(2):71–5.

163. Tripodi A, Mannucci PM. Abnormalities of hemostasis in chronic liver disease: reappraisal of their clinical significance and need for clinical and laboratory research. J HEPATOL 2007; 46(4):727–33.

164. Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, Clerici M, Cazzaniga M, Primignani M et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. HEPATOLOGY 2005; 41(3):553–8.

165. Kohn B, Weingart C, Giger U. Haemorrhage in seven cats with suspected anticoagulant rodenticide intoxication. J FELINE MED SURG 2003; 5(5):295–304.

166. Hart SW, Nolte I. Hemostatic disorders in feline immunodeficiency virus-seropositive cats. *J VET INTERN MED* 1994; 8(5):355–62.
167. Grindem CB, Corbett WT, Ammerman BE, Tomkins MT. Seroepidemiologic survey of feline immunodeficiency virus infection in cats of Wake County, North Carolina. *J AM VET MED ASSOC* 1989; 194(2):226–8.
168. Laforcade A de. Diseases associated with thrombosis. *TOP COMPANION ANIM MED* 2012; 27(2):59–64.
169. Norris CR, Griffey SM, Samii VF. Pulmonary thromboembolism in cats: 29 cases (1987-1997). *J AM VET MED ASSOC* 1999; 215(11):1650–4.
170. Smith SA, Tobias AH, Jacob KA, Fine DM, Grumbles PL. Arterial thromboembolism in cats: acute crisis in 127 cases (1992-2001) and long-term management with low-dose aspirin in 24 cases. *J VET INTERN MED* 2003; 17(1):73–83.
171. Schermerhorn T, Pembleton-Corbett JR, Kornreich B. Pulmonary thromboembolism in cats. *J VET INTERN MED* 2004; (18):533–5.
172. Laste NJ, Harpster NK. A retrospective study of 100 cases of feline distal aortic thromboembolism: 1977-1993. *J AM ANIM HOSP ASSOC* 1995; 31(6):492–500.
173. Atkins CE, Gallo AM, Kurzman ID, Cowen P. Risk factors, clinical signs, and survival in cats with a clinical diagnosis of idiopathic hypertrophic cardiomyopathy: 74 cases (1985-1989). *J AM VET MED ASSOC* 1992; 201(4):613–8.
174. Peterson EN, Moise NS, Brown CA, Erb HN, Slater MR. Heterogeneity of hypertrophy in feline hypertrophic heart disease. *J VET INTERN MED* 1993; 7(3):183–9.
175. Sottiaux J, Franck M. Cranial vena caval thrombosis secondary to invasive mediastinal lymphosarcoma in a cat. *J SMALL ANIM PRACT* 1998; 39(7):352–5.
176. Rogers CL, O'Toole TE, Keating JH, Penninck DG, Webster, C R L. Portal vein thrombosis in cats: 6 cases (2001-2006). *J VET INTERN MED* 2008; 22(2):282–7.
177. Fuentes VL. Arterial thromboembolism: risks, realities and a rational first-line approach. *J FELINE MED SURG* 2012; 14(7):459–70.

178. Stokol T, Brooks M, Rush JE, Rishniw M, Erb H, Rozanski E et al. Hypercoagulability in cats with cardiomyopathy. *J VET INTERN MED* 2008; 22(3):546–52.
179. Bedard C, Lanevski-Pietersma A, Dunn M. Evaluation of coagulation markers in the plasma of healthy cats and cats with asymptomatic hypertrophic cardiomyopathy. *VET CLIN PATH* 2007; 36(2):167–72.
180. Boudreaux MK, Weiss RC, Cox N, Spano JS. Evaluation of antithrombin-III activity as a coindicator of disseminated intravascular coagulation in cats with induced feline infectious peritonitis virus infection. *AM J VET RES* 1989; 50(11):1910–3.
181. Dircks B, Nolte I, Mischke R. Haemostatic abnormalities in cats with naturally occurring liver diseases. *VET J* 2012; 193(1):103–8.
182. Conner BJ, Hanel RM, Brooks MB, Cohn LA, Birkenheuer AJ. Coagulation abnormalities in 5 cats with naturally occurring cytauxzoonosis. *J VET EMERG CRIT CARE* 2015; 25(4):538–45.
183. Toulza O, Center SA, Brooks MB, Erb HN, Warner KL, Deal W. Evaluation of plasma protein C activity for detection of hepatobiliary disease and portosystemic shunting in dogs. *J AM VET MED ASSOC* 2006; 229(11):1761–71.
184. Laforcade AM de, Rozanski EA, Freeman LM, Li W. Serial evaluation of protein C and antithrombin in dogs with sepsis. *J VET INTERN MED* 2008; 22(1):26–30.
185. Mayhew PD, Savigny MR, Otto CM, Brown DC, Brooks MB, Bentley AM et al. Evaluation of coagulation in dogs with partial or complete extrahepatic biliary tract obstruction by means of thromboelastography. *J AM VET MED ASSOC* 2013; 242(6):778–85.
186. Donahue SM, Brooks M, Otto CM. Examination of hemostatic parameters to detect hypercoagulability in dogs with severe protein-losing nephropathy. *J VET EMERG CRIT CARE* 2011; 21(4):346–55.
187. D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Esmon CT, Comp PC. Acquired deficiencies of protein S. *J CLIN INVEST* 1988; (Volume 81):1445–54.

188. Erem C, Ersoz HO, Karti SS, Ukinc K, Hacıhasanoglu A, Deger O et al. Blood coagulation and fibrinolysis in patients with hyperthyroidism. *J ENDOCRINOL INVEST* 2002; 25(4):345–50.
189. Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR, Briët E, Blann AD. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *LANCET* 1995; 345(8943):152–5.
190. Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *NEW ENGL J MED* 2000; 342(10):696–701.
191. Basu D, Gallus A, Hirsh J, Cade J. A prospective study of the value of monitoring heparin treatment with the activated partial thromboplastin time. *NEW ENGL J MED* 1972; 287(7):324–7.
192. Hirsch J, Warkentin TE, Raschke R, Granger C, Ohman EM, Dalen JE. Heparin and low-molecular-weight heparin. *CHEST* 1998; 114(5):489S–510S.
193. Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. *NEW ENGL J MED* 1997; 337(10):688–98.
194. Quick AJ. The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice. *J BIOL CHEM* 1935; 109(1):xxiii–xxiv.
195. Tripodi A, Caldwell SH, Hoffman M, Trotter JF, Sanyal AJ. Review article: the prothrombin time test as a measure of bleeding risk and prognosis in liver disease. *ALIMENT PHARM THER* 2007; 26(2):141–8.
196. Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests; a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. *J LAB CLIN MED* 1953; 41(4):637–47.
197. Proctor RR, Rapaport SI. Partial thromboplastin time with kaolin - a simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *AM J CLIN PATHOL* 1961; 36(3):212–219.
198. White GC. The partial thromboplastin time: defining an era in coagulation. *J THROMB HAEMOST* 2003; 1(11):2267–70.

199. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. ACTA HAEMATOL 1957; 17(4):237–46.
200. Chick H, Martin CJ. On the "heat coagulation" of proteins. J PHYSIOL 1910; (40):404–30.
201. Millar HR, Simpson JG, Stalker AL. An evaluation of the heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation. J CLIN PATH 1971; 24(9):827–30.
202. Griffin JH, Cochrane CG. Human factor XII (Hageman factor). In: Lorand L, editor. Proteolytic Enzymes; Part B. New York: Academic Press; 1976. p. 56–65 (Methods in Enzymology; XLV).
203. Brotman DJ, Segal JB, Jani JT, Petty BG, Kickler TS. Limitations of D-dimer testing in unselected inpatients with suspected venous thromboembolism. AM J MED 2003; 114(4):276–82.
204. Brooks MB. Evaluation of a chromogenic assay to measure the factor Xa inhibitory activity of unfractionated heparin in canine plasma. VET CLIN PATH 2004; 33(4):208–14.
205. Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: an update. CLIN CHIM ACTA 2003; 334(1-2):5–23.
206. American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) Quality Assurance and Laboratory Standard Committee. Guidelines for the determination of reference intervals in veterinary species and other related topics: SCOPE [<https://www.asvcp.org/pubs/pdf/RI%20Guidelines%20For%20ASVCP%20website.pdf>].
207. Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. VET CLIN PATH 2012; 41(4):441–53.
208. Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun J-P. Reference values: a review. VET CLIN PATH 2009; 38(3):288–98.
209. Harris EK, Boyd JC. Statistical bases of reference values in laboratory medicine. 10th ed. New York: M. Dekker; 1995. (Statistics, textbooks and monographs; vol 146).
210. Linnet K. Two-stage transformation systems for normalization of reference distributions evaluated. CLIN CHEM 1987; 33(3):381–6.

211. Killingsworth CR, Weiss DJ, Eyster GE, Bartlett PC, Bell TG. Screening coagulation tests in the cat: reference values based on direct venipuncture and catheterized samples. VET CLIN PATH 1985; 14(3):19–23.
212. Bigge LA, Brown DJ, Penninck DG. Correlation between coagulation profile findings and bleeding complications after ultrasound-guided biopsies: 434 cases (1993-1996). J AM ANIM HOSP ASSOC 2001; 37(3):228–33.
213. Brazzell JL, Borjesson DL. Evaluation of plasma antithrombin activity and D-dimer concentration in populations of healthy cats, clinically ill cats, and cats with cardiomyopathy. VET CLIN PATH 2007; 36(1):79–84.
214. Estrin MA, Wehausen CE, Jessen CR, Lee JA. Disseminated intravascular coagulation in cats. J VET INTERN MED 2006; 20(6):1334–9.
215. Randolph JF, DeMarco J, Center SA, Kantrowitz L, Crawford MA, Scarlett JM et al. Prothrombin, activated partial thromboplastin, and proteins induced by vitamin K absence or antagonists clotting times in 20 hyperthyroid cats before and after methimazole treatment. J VET INTERN MED 2000; 14(1):56–9.
216. Mischke R, Deniz A, Nolte I. Messung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren VIII:C, IX, XI und XII bei der Katze. ZBL VET MED A 1995; 42(8):513–20.
217. Vargo CL, Taylor SM, Carr A, Jackson ML. The effect of a low molecular weight heparin on coagulation parameters in healthy cats. CAN J VET RES 2009; 73(2):132–6.
218. Alwood AJ, Downend AB, Brooks MB, Slensky KA, Fox JA, Simpson SA et al. Anticoagulant effects of low-molecular-weight heparins in healthy cats. J VET INTERN MED 2007; 21(3):378–87.
219. Ricós C, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Iglesias N, Jiménez CV et al. The reference change value: a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. SCAND J CLIN LAB INV 2004; 64(3):175–84.
220. American Society for Veterinary Clinical Pathology Qualitätssicherungs- und Laborstandard-Kommission. Qualitätskontroll-Richtlinien: Neu formatierte und überarbeitete ASVCP Qualitätskontrollrichtlinien Prinzipien der Qualitätssicherung und Qualitätsstandards für die Veterinärmedizinische Labordiagnostik

[https://www.asvcp.org/about/committees/pdf/ASVCP_General_QALS-German.pdf]:

American Society for Veterinary Clinical Pathology.

221. Westgard JO. Basic method validation: Training in analytical quality management for healthcare laboratories. 3. Edition: Westgard QC; 2008.

222. Harr K.E., Flatland B., Nabity M. B., Freeman K. P. ASVCP guidelines allowable total error: Biochemistry

[https://www.asvcp.org/about/committees/pdf/ASVCP_Allowable_Total_Error_Recommendations-Biochemistry.pdf]: American Society for Veterinary Clinical Pathology; 2013.

223. U.S. Government Publishing Office. CLIA Proficiency Testing criteria. FED REG 1992; 57(40):7002–186.

224. Westgard QC. Quality requirements: Desirable biological variation database specifications [www.westgard.com/biodatabase1.htm, abgerufen am 14.02.2017].

225. Nabity MB, Harr KE, Camus MS, Flatland B, Vap LM. ASVCP guidelines: Allowable total error hematology. VET CLIN PATH 2018; 47(1):9–21.

226. Walton RM. Subject-based reference values: Biological variation, individuality, and reference change values. VET CLIN PATH 2012; 41(2):175–81.

227. Eralp Inan O. Establishment of reference intervals for kaolin-activated TEG and the STA compact automated analyzer for dogs and coagulation response in a canine model of endotoxemia. 1. Aufl. Giessen: VVB Laufersweiler; 2011.

228. Mischke R, Deniz A, Nolte I. An optimized method for the measurement of the coagulation factor II, factor V, factor VII and factor X in the cat. DTSCH TIERÄRZTL WSCHR 1994; 101(11):430–3.

229. Diagnostica STAGO. Operator's manual STA Compact: In vitro diagnostic analyser; REF28299(0931032J).

230. Bauer N, Eralp O, Moritz A. Reference intervals and method optimization for variables reflecting hypocoagulatory and hypercoagulatory states in dogs using the STA Compact (R) automated analyzer. J VET DIAGN INVEST 2009; 21(6):803–14.

231. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition.: CLSI document C28-A3c [C28-A3c] 2008; 28(30).
232. Geffre A, Concordet D, Braun J-P, Trumel C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. VET CLIN PATH 2011; 40(1):107–12.
233. American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) Quality Assurance and Laboratory Standard Committee. Allowable Total Error Recommendations: Allowable Total Error Worksheet [<https://www.asvcp.org/pubs/qas/index.cfm>].
234. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Hemolysis, icterus, and lipemia/turbidity indices as indicators of interference in clinical laboratory analysis; approved Guideline: C56-A. CLSI 2012; 32(10).
235. Sinton TJ, Cowley, D. M. Bryant, S. J. Reference intervals for calcium, phosphate, and alkaline phosphatase as derived on the basis of multichannel-analyzer profiles. CLIN CHEM 1986; 31(1):76–9.
236. Höhle P. Zur Übertragbarkeit tierexperimenteller endovaskulärer Studien: Unterschiede der Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systeme bei häufig verwendeten Tierspezies im Vergleich zum Menschen [Dissertation]: Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen; 2000.
237. Lutze G, Kutschmann K. Untersuchungen zum plasmatischen Gerinnungssystem der Hauskatze. BERL MUNCH TIERARZTL WOCHENSCHR 1991; 104(2):53–7.
238. Reynolds BS. Determination of reference intervals for plasma biochemical values in clinically normal adult domestic shorthair cats by use of a dry-slide biochemical analyzer. J AM VET MED ASSOC 2008; 232(8):1185.
239. Wiinberg B, Jensen AL, Kjølgaard-Hansen M, Rojkaer R, Johansson PI, Gade LP et al. Study on biological variation of haemostatic parameters in clinically healthy dogs. VET J 2007; 174(1):62–8.

240. Wada Y, Kurihara M, Toyofuku M, Kawamura M, Iida H, Kayamori Y et al. Analytical goals for coagulation tests based on biological variation. CLIN CHEM LAB MED 2004; 42(1):79–83.
241. Melzi d'Eril G, Anesi A, Rizzo V, Trotti R. Biological variation in protein C, protein S and antithrombin concentrations in plasma of healthy subjects. CLIN CHEM LAB MED 1997; 35(4).
242. Chen Q, Shou W, Wu W, Guo Y, Zhang Y, Huang C et al. Biological and analytical variations of 16 parameters related to coagulation screening tests and the activity of coagulation factors. SEMIN THROMB HEMOST 2015; 41(3):336–41.
243. Kristoffersen A-H, Petersen PH, Sandberg S. A model for calculating the within-subject biological variation and likelihood ratios for analytes with a time-dependent change in concentrations; exemplified with the use of D-dimer in suspected venous thromboembolism in healthy pregnant women. ANN CLIN BIOCHEM 2012; 49(Pt 6):561–9.
244. Reed GF, Lynn F, Meade BD. Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. CLIN VACCINE IMMUNOL 2002; 9(6):1235–9.
245. American Society for Veterinary Clinical Pathology. ASVCP guidelines allowable total error: Biochemistry
[http://asvcp.org/about/committees/pdf/ASVCP_Allowable_Total_Error_Recommendations-Biochemistry.pdf].
246. Favaloro EJ, Funk DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. LAB MED 2012; 43(2):1.2-10.
247. Lippi G, Montagnana M., Salvagno G. L., Guidi GC. Interference of blood cell lysis on routine coagulation testing. ARCH PATHOL LAB MED 2006; 120(2):181–4.
248. Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Interference in coagulation testing: focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. SEMIN THROMB HEMOST 2013; 39(3):258–66.
249. van der Merwe L, Reyers F. The effect of hemolysis on plasma antithrombin activity as determined by a chromogenic method. VET CLIN PATH 2007; 36(1):55–9.

250. Moreno P, Ginel PJ. Effects of haemolysis, lipaemia and bilirubinaemia on prothrombin time, activated partial thromboplastin time and thrombin time in plasma samples from healthy dogs. *RES VET SCI* 1999; 67(3):273–6.
251. Bateman SW, Mathews KA, Abrams-Ogg AC, Lumsden JH, Johnstone IB. Evaluation of the effect of storage at -70 degrees C for six months on hemostatic function testing in dogs. *CAN J VET RES* 1999; 63(3):216–20.
252. Heil W, Grunewald R, Amend M, Heins M. Influence of time and temperature on coagulation analytes in stored plasma. *CLIN CHEM LAB MED* 1998; 36(7):459–62.
253. Yaxley PE, Beal MW, Jutkowitz LA, Hauptman JG, Brooks MB, Hale AS et al. Comparative stability of canine and feline hemostatic proteins in freeze-thaw-cycled fresh frozen plasma. *J VET EMERG CRIT CARE* 2010; 20(5):472–8.
254. Greene CE, Beck BB. Coagulation properties of fresh-frozen canine plasma during prolonged storage. *AM J VET RES* 1980; 41(1):147–50.
255. Sánchez-Vizcaíno F, Noble P-JM, Jones PH, Menacere T, Buchan I, Reynolds S et al. Demographics of dogs, cats, and rabbits attending veterinary practices in Great Britain as recorded in their electronic health records. *BMC Vet Res* 2017; 13(1):218.
256. Toribio J-ALM, Norris JM, White JD, Dhand NK, Hamilton SA, Malik R. Demographics and husbandry of pet cats living in Sydney, Australia: Results of cross-sectional survey of pet ownership. *J FELINE MED SURG* 2009; 11(6):449–61.
257. Öhlund M, Fall T, Ström Holst B, Hansson-Hamlin H, Bonnett B, Egenvall A. Incidence of diabetes mellitus in insured Swedish cats in relation to age, breed and sex. *J VET INTERN MED* 2015; 29(5):1342–7.
258. Reynolds BS, Concordet D, Germain CA, Daste T, Boudet KG, Lefebvre HP. Breed dependency of reference intervals for plasma biochemical values in cats. *J VET INTERN MED* 2010; 24(4):809–18.
259. Ghys LFE, Paepe D, Duchateau L, Taffin ERL, Marynissen S, Delanghe J et al. Biological validation of feline serum cystatin C: The effect of breed, age and sex and establishment of a reference interval. *VET J* 2015; 204(2):168–73.

260. Paepe D, Verjans G, Duchateau L, Piron K, Ghys L, Daminet S. Routine health screening: Findings in apparently healthy middle-aged and old cats. *J FELINE MED SURG* 2013; 15(1):8–19.
261. Javadi S, Slingerland LI, van de Beek, M., G., Boer P, Boer, W., H., Mol JA et al. Plasma renin activity and plasma concentrations of aldosterone, cortisol, adrenocorticotrophic hormone, and α -melanocyte–stimulating hormone in healthy cats. *J VET INTERN MED* 2004; 18(5):625.
262. Kummeling A, Teske E, Rothuizen J, Sluijs FJ. Coagulation profiles in dogs with congenital portosystemic shunts before and after surgical attenuation. *J VET INTERN MED* 2006; 20(6):1319–26.
263. Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *BLOOD* 1992; 80(8):1998–2005.
264. Lowe GDO, Rumley A, Woodward M, Morrison CE, Philippou H, Lane DA et al. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: The third Glasgow Monica survey I. illustrative reference ranges by age sex and hormone use. *BRIT J HAEMATOL* 1997; 97(4):775–84.
265. Miale JB. The fibrometer system for routine coagulation tests: Prothrombin time and partial thromboplastin time, macro and micro. *AM J CLIN PATHOL* 1965; 43(5):475–80.
266. Sibley C, Singer JW. Comparison of the fibrometer system and the bio/data coagulation analyzer. *AM J CLIN PATHOL* 1972; 57(3):369–72.
267. Quick AJ. On the quantitative estimation of prothrombin. *AM J CLIN PATHOL* 1945; 15(12):560–6.
268. Tate JR, Yen T, Jones GRD. Transference and validation of reference intervals. *CLIN CHEM* 2015; 61(8):1012–5.
269. Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J, Grezchnik E, Easton L. Cross-laboratory audit of normal reference ranges and assessment of ABO blood group, gender and age on detected levels of plasma coagulation factors. *BLOOD COAGUL FIBRIN* 2005; 16(8):597–605.

270. Gallimore MJ, Harris SL, Jones DW, Winter M. Plasma levels of factor XII, prekallikrein and high molecular weight kininogen in normal blood donors and patients having suffered venous thrombosis. *THROMB RES* 2004; 114(2):91–6.
271. Svensson PJ, Zoller B, Dahlback B. Evaluation of original and modified APC-resistance tests in unselected outpatients with clinically suspected thrombosis and in healthy controls. *THROMB HAEMOSTASIS* 1997; 77(2):332–5.
272. Col R, Montgomery A, Iazbik MC, Defelice A, Saavedra PV, Couto G. Whole-blood thrombelastography using calcium chloride activation in healthy cats. *TURK J VET ANIM SCI* 2013; 37(1):68–75.
273. Cornell University College of Veterinary Medicine ECLINPATH. Protein C [<http://www.eclinpath.com/hemostasis/tests/inhibitors/protein-c/>, abgerufen am 18.04.2017].
274. Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, Islam S, Tait RC. A study of Protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: Influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *BRIT J HAEMATOL* 2001; 113(3):636–41.
275. Gorton HJ, Warren ER, Simpson NAB, Lyons GR, Columb MO. Thromboelastography identifies sex-related differences in coagulation. *ANESTH ANALG* 2000; 91(5):1279–81.
276. Meade TW, Dyer S, Howarth DJ, Imeson JD, Stirling Y. Antithrombin III and procoagulant activity: Sex differences and effects of the menopause. *BRIT J HAEMATOL* 1990; 74(1):77–81.
277. Dolan G, Neal K, Cooper P, Brown P, Preston FE. Protein C, antithrombin III and plasminogen: Effect of age, sex and blood group. *BRIT J HAEMATOL* 1994; 86(4):798–803.
278. Lemini C, Jaimez R, Franco Y. Gender and inter-species influence on coagulation tests of rats and mice. *THROMB RES* 2007; 120(3):415–9.
279. Hughes R, Thomson K, Hopkins R, Weatherall M, Wiltshire C, Wilsher M et al. Determinants of plasma D-dimer levels in a traveling population. *J THROMB HAEMOST* 2005; 3(11):2445–8.

Literaturverzeichnis

280. Mischke R. Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, V, VII und X beim gesunden Hund--
Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Rasse. BERL MUNCH TIERARZTL WOCHENSCHR
1994; 107(9):289–94.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mit ihrer Hilfe und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt

- PD Dr. Natali Bauer
- Prof. Dr. Andreas Moritz
- Claudia Bender
- Bayer Animal Health GmbH in Leverkusen, namentlich:
 - Dr. Gerald Beddies
 - Dr. Franziska Barthel
 - Cristina Munoz (R.I.P.)
- Meinen Kolleginnen aus der Zytologie und Sabine Thalmeier

Und ein ganz besonders großer Dank gilt meiner Familie, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre!

Danksagung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

Carolyn Engelen
Tierärztin aus Bonn



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6724-3



9 783835 196724 3